

promieniowania UV z hydrofobowej na hydrofilową. Reakcje osteoblastów i fibroblastów na taką modyfikację przedstawiono na FOT.1-4 i RYS.1 Jak widać na FOT.1-4 oba rodzaje komórek adherują do powierzchni PSU i PSUN i przy pomocy tej metody trudno stwierdzić jakiegokolwiek różnice w zachowaniu komórek. Żywotność osteoblastów na PSUN jest istotnie obniżona w stosunku do PSU (poziom istotności 0,05), natomiast fibroblasty nie reagują zmianą żywotności na taką modyfikację. Wartości wyprodukowanego kolagenu typu I wraz z wartościami obliczonymi po uwzględnieniu żywotności przedstawiono na RYS.2 Jak widać oba typy komórek produkują mniej kolagenu na PSUN w porównaniu z PSU Zachowanie bakterii S.E na PSU i PSUN przedstawiono na FOT.5-7. Bakterie szczepu 35547 wytwarzają po 24 godz. na powierzchni PSU zorganizowaną strukturę biofilmu, natomiast na powierzchni PSUN obserwuje się tylko pojedyncze bakterie.

Wnioski

Modyfikacja folii z PSU poprzez 5 godzinne naświetlenie promieniowaniem UV zmienia charakter powierzchni z hydrofobowej na hydrofilową, co pociąga za sobą zahamowanie syntezy kolagenu przez fibroblasty i osteoblasty, nieznaczne obniżenie żywotności osteoblastów i całkowitą utratę zdolności tworzenia biofilmu przez bakterie *Staphylococcus epidermidis*.

Piśmiennictwo

- [1] Czajkowska B., Kowal J., Błażewicz M., Ptak M., Bobek M., Cieślak J. "The impact of chemical and physical modification of polysulfone surface on cellular reactions in vitro" *Inżynieria Biomateriałów* (2004) 38-42; 157-160.
[2] Harris L.G., Tosatti S., Wieland M., Texor M., Richards R.G. "Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* (2004) 25; 4135-4148.

fications have been shown in PHOTOS 1-4 and FIG.1. As can be seen in photos 1-4 both types of cells adhere to PSU and PSUN surfaces. With this method it is difficult to observe any differences in cell behaviour relative to the reference sample, polystyrene coat in this case. Osteoblast proliferation on PSUN is significantly lower than that of PSU (significance level 0,05), while the proliferation of fibroblasts does not change. The value of the produced collagen I together with the values calculated with proliferation taken into account have been shown in FIG.2. Both types of cells evidently produce less collagen on PSUN than on PSU surfaces. The behaviour of S.E. bacteria on PSU and PSUN has been shown in photos 7-10. Bacteria strain 35547 produce an organised biofilm on the PSU surface after 24 hours, while on the PSUN surface only individual bacteria are observed.

Conclusions

Modification of PSU foil exposed to 5hr UV radiation changes the character of surface from hydrophobic into hydrophilic, which impedes collagen synthesis by fibroblasts and osteoblasts, causes slightly lower proliferation of osteoblasts and complete loss of ability to form the biofilm by *Staphylococcus epidermidis* bacteria.

References

- [3] Rohde H., Burdelski C., Bartscht K., Hussain M., Buck F. "Induction of staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases" *Molecular Microbiology* (2005) 55; 1883-1896.
[4] Vuong C., Otto M. "Staphylococcus epidermidis infections" *Microbes and Infection* (2002), 4; 481-489.

STERYLIZACJA RADIACYJNA POLIURETANÓW STOSOWANYCH W INŻYNIERII TKANKOWEJ

GRAŻYNA PRZYBYTNIK*, EWA KORNACKA*, MONIKA BILL**, JOANNA RYSZKOWSKA**

*INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ,
03-195 WARSZAWA, DORODNA 16,
** WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
02-507 WARSZAWA, WOŁOSKA 141.

[*Inżynieria Biomateriałów, 47-53, (2005), 154-157*]

Wstęp

Opracowanie rusztołów stosowanych podczas regeneracji tkanek wymaga pełnego zrozumienia procesów chemicznych i fizycznych zachodzących w materiale, z którego zostały wykonane. Jednym z ważniejszych aspektów tworzenia takich kompozycji jest wybór metody sterylizacji

RADIATION STERILIZATION OF POLYURETHANE BASED MATERIALS USED IN TISSUE ENGINEERING

GRAŻYNA PRZYBYTNIK*, EWA KORNACKA*, MONIKA BILL**, JOANNA RYSZKOWSKA**

*INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY,
03-195 WARSZAWA, DORODNA 16,
**FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
02-507 WARSZAWA, WOŁOSKA 141.

[*Engineering of Biomaterials, 47-53, (2005), 154-157*]

Introduction

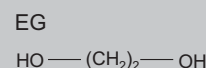
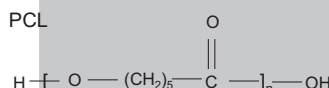
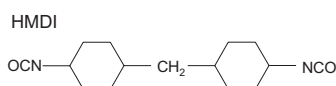
Preparation of scaffolds for tissue regeneration requires better understanding of chemical and physical processes proceeded in the materials. One of the most important aspects of the production of designed resins is sterilization

zastosowanej do usunięcia skażenia mikrobiologicznego. Najbardziej odpowiednie do tego celu wydaje się zastosowanie promieniowania jonizującego, które penetruje nie tylko powierzchnię polimeru, ale również całą objętość napromieniowanego obiektu. Już dawka 25 kGy skutecznie eliminuje poziom zawartych zanieczyszczeń mikroorganizmów. Jednak proces ten inicjuje również inne zmiany, pożądane i niepożądane, w napromieniowanym materiale prowadzące odpowiednio albo do jego usieciowania lub degradacji. Sieciowanie zmienia liniowy polimer w trójwymiarową cząsteczkę, co powoduje zmniejszenie rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych, a także poprawę właściwości mechanicznych. Natomiast w wyniku procesu degradacji ciężar cząsteczkowy maleje, a właściwości materiału ulegają pogorszeniu.

Elastomery poliuretanowe w zakresie dawek sterylizacyjnych są materiałami odpornymi radiacyjnie [1,2]. Jednakże, jeśli w układzie pojawią się dodatkowe segmenty estrowe, wtedy wpływ promieniowania jest trudny do przewidzenia. Zatem podjęto metodą EPR badanie wolnych rodników generowanych przez promieniowanie jonizujące w kopolimerze uzyskanym z następujących komponentów: alifatycznego diizocyanianu, poli ϵ -kaprolaktonu i glikolu etylenowego. Poddany sterylizacji materiał składa się ze sztywnych segmentów zawierających grupy uretanowe i miękkich hydrofilowych segmentów z grupami estrowymi. W celu zidentyfikowania pierwotnych i wtórnych produktów uzyskanych kopolimerów ich widma były porównywane z sygnałami EPR surowców.

Materiały i metody

Poliuretany sporządzono z diizocyanianu dicykloheksylometanu (HMDI), poli ϵ -kaprolaktonu (PCL) i glikolu etylenowego (EG). W otrzymanych elastomerach składniki występują w następujących proporcjach molowych HMDI:PCL:EG=4:1:3 dla polimeru P413 i 2:1:1 dla polimeru P211. Średni ciężar cząsteczkowy oligomeru PCL wynosił 1250 w elastomerze P413 i 530 w P211.



Napromieniowane w ciekłym azocie próbki umieszczone w dewarze palcowym badano metodą EPR w spektrometrze ESP 300 z wnęką prostokątną TE 102. Liczba akumulacji i wzmocnienie były dostosowywane każdorazowo do intensywności sygnału. Względne stężenie i analiza widm eksperymentalnych była przeprowadzona za pomocą programu Apollo poprzez porównanie drugich pochodnych widm. Zanik rodników był monitorowany po ogrzaniu próbek do temperatur wskazanych na rysunkach. Pomiarów kąta zwilżania dokonano przy użyciu tensjometru firmy Krüss.

Wyniki

Badania były przeprowadzone w warunkach kriogenicznych, gdyż rodniki w temperaturze otoczenia okazały się nietrwałe i szybko zanikały tworząc produkty diamagnetyczne. Widma otrzymane w 77K wskazują, że w obu badanych materiałach co najmniej część rodników jest taka sama. Początkowo dominującym składnikiem widm jest słabo rozdzielony triplet, którego linie dzieli 1.15 mT. Rodniki P211 szybciej ulegają utlenieniu tworząc rodnik nadtlenkowy już powyżej 160K, podczas gdy w P413 produkt ten pojawia się dopiero w 190K. Zanika on do 280K, równoległe z pro-

necessarily to eliminate bioburdens not only from the surface but from the scaffold inside as well. The most appropriate seems to be application of ionising radiation that, penetrating whole volume of material after a dose of 25 kGy, efficiently limits level of microorganisms. However such treatment induces many undesired and desired reactions that lead either to degradation or crosslinking of macromolecules (respectively). Crosslinking transforms a linear polymer into a three-dimensional molecule, resulting in lower solubility in organic solvents and improvement of mechanical properties. On the other hand, the decrease in molecular weight is a consequence of degradation and leads to worsening of polymer properties.

Elastomeric polyurethanes are known to be radiation stable materials in sterilizing dose range [1,2]. Nevertheless, if additional components appear in the system, e.g. segments of polyesters, then the influence of irradiation is unpredictable. Thus, we have studied free radicals generated by ionizing radiation in copolymers synthesized from bis-(4-isocyanatocyclohexyl), poly(ϵ -caprolactane)diol and ethylene glycol using for their detection EPR method. The copolymers consist of urethane hard units and ester hydrophilic soft segments. In order to identify paramagnetic primary and secondary intermediates the constituents were examined and their spectra were compared to the experimental signals of the resulting resin.

Materials and methods

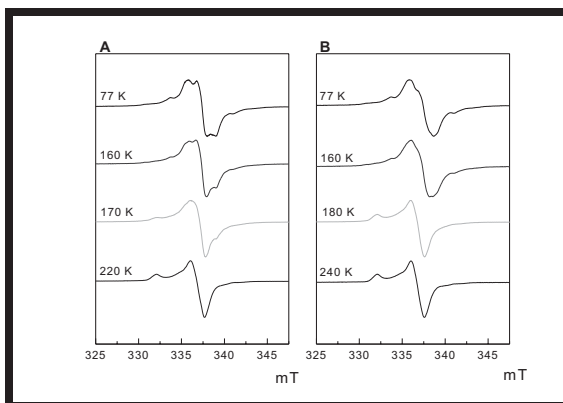
The polyurethane based materials were prepared from bis-(4-isocyanatocyclohexyl) (HMDI), poly(ϵ -caprolactane)diol (PCL) and ethylene glycol (EG) used as a chain-extending agent. The resulting elastomers contain the components of the following molar ratios HMDI:PCL:EG=4:1:3 for P413 and 2:1:1 for P211. PCL oligomers have various molecular weights - 1250 in P413 and 530 in P211.

Irradiated at liquid nitrogen samples were inserted into dewar and measured using EPR spectrometer ESP 300 with rectangular cavity TE102. The number of accumulations and

amplification was always adjusted according to the intensity of the signal. Relative radical concentrations and analysis of the experimental spectra were performed by comparison of the spectral areas obtained by double integration using the program Apollo. Decay of radicals was monitored upon annealing to temperatures indicated in the figures. The contact angle was measured with a tensiometer K100C, Krüss.

Results

The measurements were carried out under cryogenic conditions since the radicals generated at ambient temperature were unstable and decay fast to diamagnetic species. Spectra recorded at 77K indicate that in both studied materials at least part of radicals is identical (FIG.1). The dominant component of spectrum measured at 77K is an unresolved triplet that lines are separated by approximately 1.15 mT. P211 radicals oxidise faster forming peroxy radicals just above 160K whereas in P413 such product appears already at 190K. They can be detected to 280K together with radical that appears in the same range of temperatures and exhibits a wide signal of low intensity.



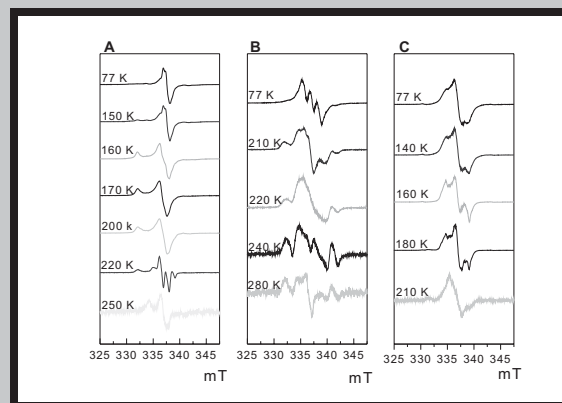
RYS. 1. Widna EPR napromienionego kopolimeru poliuretanu (A) P211 i (B) P413 zmierzone w 77K i po ogrzaniu do wskazanych temperatur.

FIG. 1. EPR spectra of irradiated polyurethane based materials (A) P413 and (B) P211 detected at 77K and following annealing to indicated temperatures.

duktem powstającym w przedziale temperatur 160-200 K i wykazującym szeroki sygnał o małej intensywności.

Powyżej 130K zanik wszystkich rodników zachodzi proporcjonalnie do wzrostu temperatury, co wskazuje na stopniową rekombinację produktów paramagnetycznych do diamagnetycznych. Widma doświadczalne składają się z superpozycji absorpcji wielu rodników, co w przypadku kopolimerów jest efektem oczekiwanym. Aby jednoznacznie zidentyfikować poszczególne rodniki i mery odpowiedzialne za lokalizację spinu przeprowadzono dodatkowe badania surowców. Stwierdzono, że trzy linie o dużej intensywności występujące w kopolimerach należą do segmentów kaprolaktonu, co wskazuje, że procesy indukowane promieniowaniem jonizującym nie zachodzą addytywnie, a estry są składnikami kopolimeru najbardziej wrażliwymi na promieniowanie. Niesparowane elektrony nie są przenoszone pomiędzy segmentami, ponieważ szeroki sygnał wyraźnie obserwowany w wysokich temperaturach (poza asymetrycznym widmem rodnika nadtlenkowego) również odpowiada cząsteczce kaprolaktonu. Biorąc pod uwagę wagowy stosunek komponentów HMDI:PCL:EG, który dla P413 wynosi 47:47:7, a dla P211 43:50:7, można oczekiwać porównywalnych udziałów rodników uretanowych i estrowych. Jednak stężenie rodników uretanowych nie przekracza 10%. Ich widmo w postaci dwóch linii odległych o 2,20 mT świadczy prawdopodobnie o obecności rodnika $-\dot{\text{C}}\text{H}^{\ominus}$ usytuowanego pomiędzy dwoma grupami cykloheksylu [3].

Analiza widm badanych materiałów i ich surowców wskazuje, że rodnik nadtlenkowy występujący w kopolimerach tworzy się głównie w wyniku utleniania rodnika dimetyloheksylowego, podczas gdy rodniki PCL są bardziej odporne na utlenianie. Rodniki $\equiv\text{COO}^{\bullet}$ są prekursorami grup polarnych i determinują właściwości powierzchniowe, w tym kąt zwilżania. Jednak jego średnia wartość dla wody rośnie po napromieniowaniu z 85 deg do 95 deg. Dlatego wydaje się, że sterylizacja radiacyjna wpływa równocześnie na degradację występujących w materiałach grup polarnych, co może prowadzić do pogorszenia adhezji komórek na powierzchni kopolimerów.



RYS. 2. Widna EPR (A) diizocyjanianu, (B) poliε-kaprolaktonu diolu i (C) glikolu etylenu.

FIG. 2. EPR spectra of (A) bis-(4-isocyanatocyclohexyl) (HMDI), (B) poly(ε-caprolactane)diol and (C) ethylene glycol.

Above 130K the decay of radicals proceeds proportionally to annealing temperature suggesting gradual recombination of the paramagnetic products to diamagnetic ones. The experimental spectra consist of overlapping absorption of many radicals which is typical for copolymers. Additional studies were necessary to identify unambiguously the individual radicals and the constitutional units of copolymer that are responsible for the localisation of unpaired spin. We found that the three lines of high intensity observed in the spectra of copolymers belong to the poly(ε-caprolactane) segment what indicates that upon irradiation the effects are not additive and the most sensitive seems to be ester moieties. The unpaired electron is not transferred towards other units because wide signal distinctly observed at the highest temperatures (except characteristic asymmetric structure of the peroxy radical) corresponds to caprolactane moiety. Taking into account weight ratios HMDI:PCL:EG in the copolymers, which are equal 46:47:7 for P413 and 43:50:7 for P211, the comparable participation of urethane and ester radical might be expected. However the content of urethane radicals is low and does not exceed 10%. Its spectrum in form of two lines separated by 2.20 mT represents probably $-\dot{\text{C}}\text{H}^{\ominus}$ radical and spin is located at carbon linking two hexyl groups [3].

Upon analysis of the spectra obtained for the resulting materials and their constituents we have concluded that peroxy radical detected in copolymers is formed predominantly after oxidation of dihexylmethyl radical, whereas PLC radicals are much more resistant towards oxidation.

The $\equiv\text{COO}^{\bullet}$ species are the precursors of polar functional groups that determine surface properties and influence on the contact angle. However the average value of the parameter measured for water increases upon irradiation from 85 deg to 95 deg. Therefore radiation sterilization probably destroys polar groups occurring in the materials what slightly weakens cell adhesion on their surface.

Conclusion

Induced by gamma-irradiation damages in two urethane based materials have been investigated by EPR spectroscopy. Results confirmed that the urethane segments are resistant towards ionising irradiation and the presence of ester units facilitates generation of free radicals. It was also found that in PCL segments ionising radiation induces

Wnioski

Indukowane promieniowaniem jonizującym zmiany w materiałach syntetyzowanych na bazie poliuretanu badano metodą spektroskopii EPR. Wyniki wskazują na wysoką odporność radiacyjną segmentów uretanowych i wzrost całkowitego stężenia rodników w obecności estrów. Stwierdzono, że w PCL promieniowanie jonizujące prowadzi do powstania rodników, dzięki którym materiał może ulegać sieciowaniu powodując jego mniejszą biodegradowalność. Zwiększenie kąta zwilżania wskazuje, że materiały stają się bardziej hydrofobowe, co nie sprzyja adhezji komórek.

Podziękowanie

Praca finansowana w ramach projektu zamawianego Ministra Nauki i Informatyzacji (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002/06).

WPŁYW STERYLIZACJI RADIACYJNEJ NA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE POLIURETANÓW DO ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH

JOANNA RYSZKOWSKA*, MONIKA BIL*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK**

*POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA:

JRYSZ@MEIL.PW.EDU.PL,

**INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ, DORODNA 16, 03-195 WARSZAWA

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),1573-159]

Wprowadzenie

Radiacja promieniami gamma lub przyspieszonymi elektronami jest najczęściej stosowanym procesem sterylizacji materiałów polimerowych do zastosowań biomedycznych. Wysoka energia promieniowania może mieć znaczący wpływ na właściwości sterylizowanych materiałów. Dwa podstawowe procesy zachodzące w polimerach pod wpływem radiacji to rozrywanie łańcuchów makrocząsteczek oraz tworzenie fizycznych i chemicznych wiązań sieciujących. W rezultacie prowadzi to do istotnych zmian właściwości chemicznych i fizycznych takich jak: zmiana ciężaru cząsteczkowego, funkcyjności wiązań, wytrzymałości, twardości, odporności termicznej i chemicznej [1]. Rodzaj zmian zachodzących w polimerze będzie przede wszystkim zależy od budowy chemicznej polimeru.

Głównym procesem zachodzącym w poliuretanach (PUR) pod wpływem radiacji jest degradacja prowadząca do zmniejszenia wytrzymałości i wydłużenia. Odporność poliuretanów na promieniowanie zależy od liczby pierścieni aromatycznych i koncentracji grup estrowych w makrocząsteczce [2]. W pracy Shintani [3] stwierdzono, że w poliuretanach wydłużanych butanodiolem pod wpływem sterylizacji radiacyjnej zachodzi przede wszystkim proces degradacji prowadzący do zmniejszenia ciężaru cząsteczkowego a w rezultacie wytrzymałości na rozciąganie. Spada również stopień krystaliczności. W pracy Gorna et al. [4] zbadano wpływ standardowej dawki promieniowania (25 kGy) stosowanej do sterylizacji biomateriałów, na biodegradowalne poliuretany o różnym stosunku segmentów hydrofilowych

significant amount of radicals that can introduce crosslinking into these molecules and reduce ability to biodegradation. The increase in water contact angle suggests that the surface of the irradiated materials become more hydrophobic.

157

Acknowledgement

This work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002/06).

Piśmiennictwo

- [1] Cooke D.W. et al., Radiat. Phys. Chem. 55 (1999) 1-13.
- [2] Shintani H., Nakamura A., J. Appl. Polym. Sci. 42 (1991) 1979-1987.
- [3] Gorna K., Gogolewski S., Polym. Degrad. Stab., 79 (2003) 465-474.

References

THE EFFECT OF RADIATION ON PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF POLYURETHANES FOR MEDICAL APPLICATIONS

JOANNA RYSZKOWSKA*, MONIKA BIL*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK**

*WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAW: JRYSZ@MEIL.PW.EDU.PL

**INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, DORODNA 16, 03-195 WARSZAW

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),157-159]

Introduction

Gamma and electron-beam radiation is the most common method of sterilization of polymer materials for biomedical applications. High-energy of radiation can have a significant influence on properties of sterilized materials. Two basic processes occurring under radiation are: macromolecules chain breaking and physical and mechanical crosslinking. As a result it leads to significant changes of chemical and physical properties including: molecular weight, functionality, tensile strength, hardness, chemical and thermal resistance [1]. Types of changes occurring in polymer depend mainly on chemical structure of polymer.

The main process occurring in polyurethane (PUR) under the radiation is the degradation leading to decrease of elongation and tensile strength. Polyurethane resistance for radiation depends on the number of aromatic rings and the concentration of ester groups in macromolecule [2]. Shintani et al. [3] reported that polyurethanes chain-extended with 1,4-butanediol mainly degrade under sterilization what lead to loss of molecular weight and as a result decrease of stress breaking. The degree of crystallinity decreases as well. Gorna et al. [4] investigated influence of standard dose (25kGy) of gamma radiation for biomaterial sterilization, on biodegradable polyurethane with various ratio of hydrophilic-to-hydrophobic segments. It showed that changes in molecular weight, tensile strength and thermal properties caused by radiation depend on polyurethane chemical structure.