

Mirosława El Fray*, Marta Piątek-Hnat*

Modyfikacja radiacyjna nanostrukturalnych biomateriałów elastomerowych zawierających alifatyczne i aromatyczne sekwencje poliestrowe

Zbadano wpływ promieniowania jonizującego na właściwości fizykochemiczne, strukturę i biogodność kopolimeru multiblokowego zbudowanego z aromatycznych segmentów sztywnych poli(tereftalanu butylenu) (PBT) i giętkich alifatycznych segmentów oligoestrowych (DLA). Kopolimer multiblokowy otrzymano w wyniku polikondensacji metodą stopową, a następnie napromieniowany różnymi dawkami promieniowania jonizującego (25, 50, 75 i 100 kGy). Analiza wyników wykazała istotne zmiany w reorganizacji struktury nadcząsteczkowej polimeru modyfikowanego najwyższą dawką promieniowania, tj. 100 kGy, co przyczyniło się do wzrostu zawartości frakcji żelowej oraz spowodowało znaczący wzrost wartości modułu. Stwierdzono również, że najwyższa dawka promieniowania jonizującego nie ma niekorzystnego wpływu na właściwości biologiczne, gdyż biogodność in vitro była porównywalna do biogodności silikonu o jakości medycznej.

Słowa kluczowe: elastomery termoplastyczne, sieciowanie radiacyjne, poliestry

Radiation modification of nanostructured elastomeric biomaterials containing aliphatic and aromatic polyesters sequences

The effect of ionizing radiation on physicochemical characteristics of a copolymer constructed from hard aromatic segments of poly(butylene terephthalate) (PBT) and soft aliphatic segments of oligoester (DLA) was investigated. This thermoplastic elastomer prepared by melt polycondensation was exposed to different doses of ionizing radiation (25, 50, 75 and 100 kGy). The analysis of the results indicated that increasing ionizing radiation doses had strong influence on physicochemical properties of thermoplastic elastomers.

Analysis of results showed significant changes in reorganization of the supermolecular structure of a polymer modified with high-dose radiation, i.e. 100 kGy, which contributed to the increase of gel fraction and caused a significant increase in modulus value. It was also found that the highest dose of ionizing radiation does not adversely affect the biological properties as biocompatibility in vitro was comparable to the biocompatibility of medical grade silicone.

Key words: thermoplastic elastomers, irradiation cross-linking, polyesters

I. Wstęp

Metody syntezy makrocząsteczek wg mechanizmu polireakcji stopniowych pozwalają na projektowanie polimerów do różnorodnych zastosowań, o właściwościach kontrolowanych poprzez udziały wagowe poszczególnych składników [1-3]. Przykładem takich polimerów są elastomery termoplastyczne (TPE), polimery o strukturze multifazowej, które można otrzymywać stosując się m.in. reakcje kondensacyjne stopniowego wzrostu makrocząsteczki. Krystaliczne lub amorficzne domeny sztywne rozproszone w fazie segmentów giętkich stano-

wią „fizyczne”, termicznie odwracalne punkty „usieciowania” nadające materiałowi charakter elastotermoplastyczny.

Do grupy elastomerów termoplastycznych należą m.in. multiblokowe poli(alifatyczno/aromatyczne-estry) (PED) o budowie segmentowej. Elastomery te cechują się nie tylko dobrymi właściwościami mechanicznymi, w tym zmęczeniowymi, ale również wysoką biogodnością [4-6].

Jedną z metod modyfikacji struktury poprawiającej właściwości mechaniczne polimerów jest ich sieciowanie wywołane m.in. przez wiązkę szybkich elektronów (promieniowanie jonizujące). Powstające w procesie napromieniowania wiązania kowalencyjne prowadzą do utworzenia usieciowanej struktury polimerów (sieciowanie chemiczne). W zależności od rodzaju polimeru podczas działania promieniowania jonizującego mogą

* Instytut Polimerów, Zakład Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin; e-mail: mirfray@zut.edu.pl; marp@zut.edu.pl

zachodzić procesy degradacji lub sieciowania. Pożądanym skutkiem pierwszego zjawiska jest wzrost szybkości biodegradacji lub hydrolizy, a także tworzenie się na skutek przyspieszonej degradacji oksydacyjnej niewystępujących wcześniej grup polarnych, zmieniających niekiedy właściwości adhezyjne powierzchni. Natomiast sieciowanie poprawia właściwości mechaniczne, zwiększa sztywność, zmniejsza pęcznienie materiału pod obciążeniem, prowadzi do wzrostu odporności termicznej i chemicznej.

Celem pracy było zbadanie wpływu dawki promieniowania na strukturę i właściwości polimerów PED, a przede wszystkim wpływu procesu obróbki radiacyjnej na ich właściwości fizykochemiczne, mechaniczne oraz biogodność komórkową.

2. Część doświadczalna

Syntezę poli(alifatyczno/aromatycznych-estrów) (PED) przeprowadzono w wyniku reakcji transestryfikacji i polikondensacji w stopie, którą opisano we wcześniejszych publikacjach [7, 8]. Badaniom poddano kopolimer zawierający 70% wag. segmentów giętkich, w skład których wchodziły sekwencje alifatyczne dimeru kwasu tłuszczowego C18 i 30% wag. segmentów sztywnych zawierających powtarzalne jednostki aromatyczne, tak jak w poli(tereftalanie butyleny) (PBT).

Próbki napromieniano w temperaturze otoczenia strumieniem wysokoenergetycznych elektronów generowanych w liniowym akceleratorze elektronów Elektronika 10/10 do wskazanych dawek (25, 50, 75 i 100 kGy).

Graniczną liczbę lepkościową (GLL, η) oznaczano w temperaturze 30°C w wiskozymetrze Ubbelohde'a (kapilara I) rozpuszczając próbki w równowagowej mieszaninie fenolu w trichloroetylenie.

Frakcję żelową usieciowanych kopolimerów oznaczono metodą ekstrakcyjną. Zawartość frakcji żelowej obliczono ze wzoru poniżej jako wartość średnią z trzech pomiarów:

$$X = m_1/m_0 \cdot 100\%$$

gdzie: m_1 – masa wysuszonej próbki po ekstrakcji, m_0 – masa próbki przed ekstrakcją.

Moduł Younga wyznaczono na podstawie wyników badań wytrzymałości na rozciąganie; do badań mechanicznych używano maszyny wytrzymałościowej „Instron” model 1161. Badania zostały wykonane zgodnie z normą PN-81/C-89034. W badaniach wytrzymałości na rozciąganie materiałów, w postaci folii o grubości 0,5 mm, prędkość przesuwu głowicy (trawersu) w maszynie wynosiła 100 mm/min.

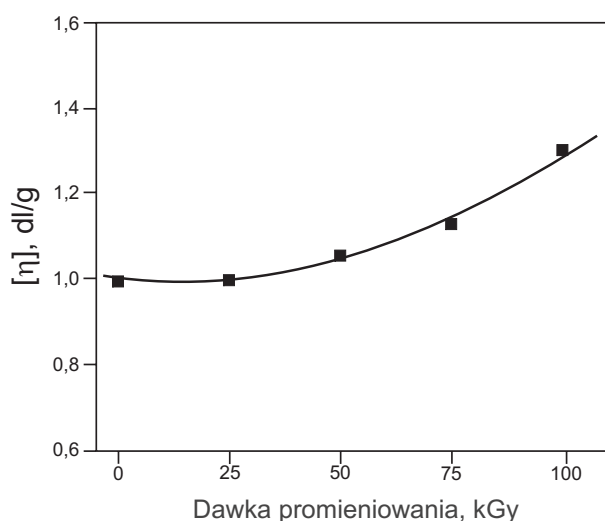
Próbki polimerów do transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) zostały przygotowane w postaci ultracienkich filmów za pomocą kriomikrotomu. Ultracienkie filmy były kontrastowane nad parami 0,2-proc. roztworu OsO₄ w temperaturze pokojowej. Kontrastowanie miało na celu zwiększenie gęstości elektronowej w obszarach amorficznych fazy segmentów giętkich, widocznej jako ciemne obszary w polu widzenia.

Badania cytokompatybilności *in vitro* wykonano zgodnie z ISO 10 993-5. Z błon polimerowych wycinano krążki o średnicy 15 mm, sterylizowano tlenkiem etylenu (EtO) i umieszczano w dołkach specjalnych płytek do hodowli komórkowych (Greiner). Fibroblasty mysie L-929 (DSMZ, Braunschweig) wysiewano w ilości 1,0 · 10⁵ komórek/ml na 24 h, w środowisku 90% RPMI 1640 (GIBCO) uzupełnionym 10% serum surowicy bydlęcej (GIBCO) i 1% Penstrep (GIBCO). Komórki były hodowane w 37 °C w nawilżanej atmosferze (RH = 95%) i 5% CO₂. Zastosowano test WST-1 do oszacowania aktywności mitochondrialnej komórek. Komórki były enzymatycznie odklejane przez trypsynizację (0,25% trypsyny w EDTA, Sigma) i automatycznie zliczane (Beckman, Coulter Z2). Wykonano cztery pomiary dla każdego materiału. Wyniki testu porównano z wartościami dla polistyrenu jako próbki kontrolnej. Wykonano analizę wariancyjną (test ANOVA) i przyjęto poziom istotności przy 0,001 > p.

3. Wyniki

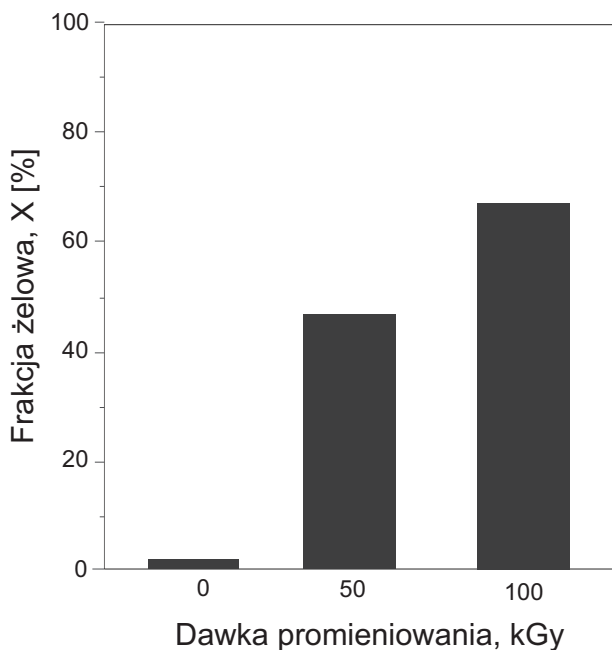
Lepkość roztworu polimeru jest bezpośrednio związana z jego masą molową. Zatem wartość granicznej liczby lepkościowej powinna wzrastać wraz z wartością lepkościowo średniej masy molowej polimeru. Na rysunku 1 przedstawiono przebieg zmian granicznej liczby lepkościowej badanego kopolimeru PED w zależności od dawki promieniowania jonizującego.

Badane kopolimery wykazywały wzrost granicznej liczby lepkościowej wraz ze wzrastającą dawką promieniowania jonizującego, co może świadczyć o korzystnym działaniu modyfikacji prowadzącej do wzrostu lepkościowo średniej masy molowej, będącej następstwem ich usieciowania, ale też i do wzrostu zawartości frakcji żelowej.



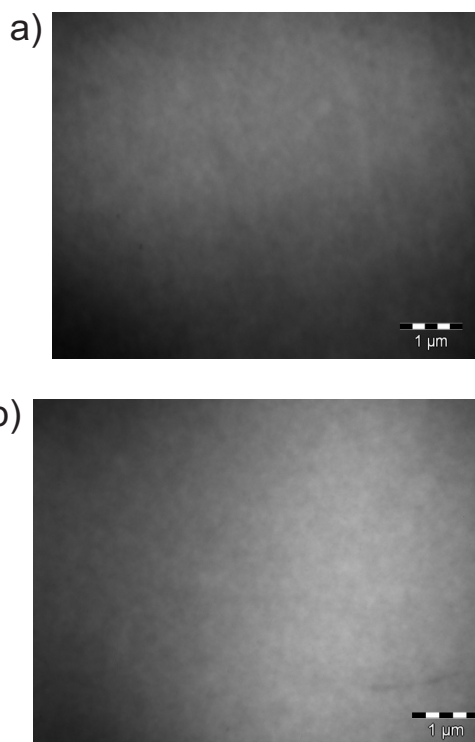
Rys. 1. Wpływ dawki promieniowania na graniczną liczbę lepkościową $[\eta]$ dla PED 30/70

Fig. 1. The influence of doses of ionizing radiation on the limiting viscosity number $[\eta]$ for PED 30/70



Rys. 2. Zależność zawartości frakcji żelowej [X] w kopolimerach PED 30/70 od dawki promieniowania jonizującego

Fig. 2. Gel fraction [X] of PED 30/70 copolymers versus doses of ionizing radiation



Rys. 3. Mikrofotografie TEM kopolimeru PED 30/70 (a) i PED 30/70 po dawce 100 kGy (b)

Fig. 3. Transmission electron micrographs (TEMs) of PED 30/70 (a) and PED 30/70 after 100 kGy dose (b)

Potwierdzeniem tych obserwacji są wyniki oznaczeń zawartości frakcji żelowej (rys. 2), na podstawie których

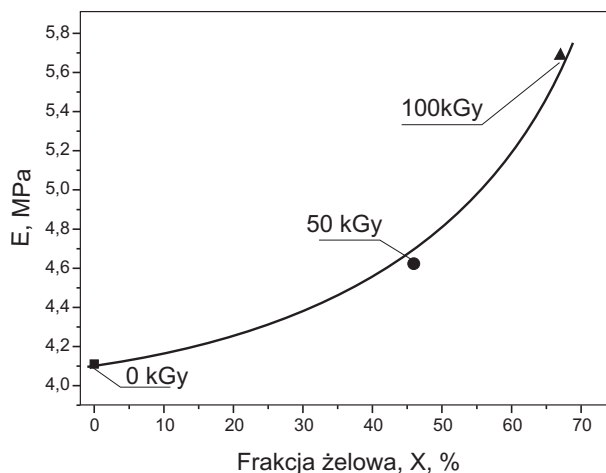
stwierdzono wzrost udziału frakcji żelowej wraz ze zwiększającą się dawką promieniowania jonizującego.

Analizę struktury nadcząsteczkowej kopolimerów PED wykonano za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Mikrofotografie na rys. 3 ilustrują mikro(nano)strukturę kopolimerów PED 30/70 przed i po modyfikacji (pokazano próbkę po dawce 100 kGy).

Jasne obszary odnoszą się do fazy segmentów sztywnych PBT, natomiast obszary ciemne informują o rozmieszczeniu fazy amorficznej (która uległa kontrastowaniu za pomocą OsO_4). Polimer PED przed modyfikacją (rys. 3a) wykazuje występowanie jasnych i ciemnych obszarów świadczących o mikroseparacji fazowej, zjawisku, które związane jest z multiblokową strukturą polimerów o cechach elastotermoplastycznych.

Zastosowanie modyfikacji promieniowaniem jonizującym wyraźnie wpływa na pojawienie się większej ilości jasnych obszarów, co może wskazywać na reorganizację struktury w obrębie twardych domen (kosztem zaniku ciemnych obszarów amorficznych).

Potwierdzeniem zachodzenia procesu sieciowania w materiałach PED było oznaczenie zmian modułu Younga (rys. 4) i powiązanie uzyskanych wyników z zawartością frakcji żelowej (rys. 2).



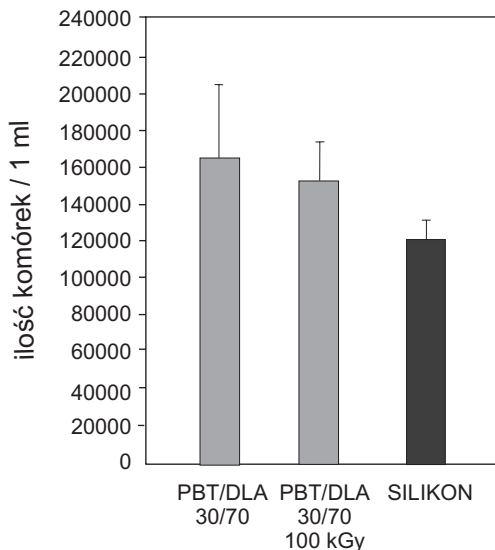
Rys. 4. Zależność modułu przy 10% odkształcenia dla kopolimerów PED (30/70) od zawartości frakcji żelowej [X]; ■ - 0 kGy, ● - 50 kGy, ▲ - 100 kGy

Fig. 4. Modulus at 10% strain of PED (30/70) copolymers versus gel fraction [X]; ■ - 0 kGy, ● - 50 kGy, ▲ - 100 kGy

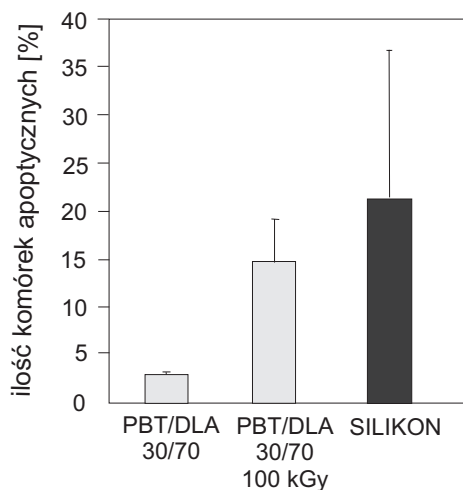
Na rys. 4 przedstawiono zależność modułu Younga od zawartości frakcji żelowej w kopolimerach PED przy różnych dawkach promieniowania. Wartość modułu Younga wzrasta wraz ze wzrastającym udziałem frakcji żelowej w kopolimerach, co jest kolejnym potwierdzeniem właściwej modyfikacji tych materiałów w kierunku sieciowania.

Badania wpływu modyfikacji polimerów PED na odpowiedź biologiczną przeprowadzono na komórkach

fibroblastów L-929. Żywotność komórek oceniono na cytometrze przepływowym barwiąc komórki roztworem jodku propidyny. Komórki żywe nie ulegały wybarwieniu (usuwały jodek propidyny z wnętrza), komórki mar-



Rys 5. Proliferacja komórek (fibroblasty L-929, 24 h) na powierzchni niemodyfikowanego kopolimeru PED, modyfikowanego promieniowaniem jonizującym (100 kGy) oraz elastomeru silikonowego o jakości medycznej
Fig. 5. Cell proliferation (L-929 fibroblasts, 24 h) on the neat PED copolymer, modified with e-beam radiation (100 kGy) and medical grade silicone



Rys. 6. Ilość komórek śmiertelnych i apoptotycznych na podłożach polimerowych zawierających PED 30/70, materiał modyfikowany dawką 100 kGy oraz komercyjny silikon
Fig. 6. Number of necrotic and apoptotic cells on polymer substrates from the neat PED copolymer, and the one modified with e-beam radiation (100 kGy) and medical grade silicone

twie i apoptyczne barwiły się jodkiem propidyny. Testy biozgodności *in vitro* pozwoliły na ocenę wzrostu (prolifracji) komórek, co przedstawiono na rys. 5, oraz ich śmiertelności i apoptozy, jak to przedstawiono na rys. 6.

Wyniki biozgodności komórkowej polimerów PED przed modyfikacją i po dawce 100 kGy (rys. 5) wskazują na wysoką liczbę namnożonych komórek, znacznie wyższą w porównaniu z materiałem kontrolnym, jakim jest elastomer silikonowy o jakości medycznej.

Z wynikami proliferacji komórek korespondują wyniki dotyczące ilości komórek nekrotycznych i apoptotycznych (apoptoza – programowana śmierć komórek). Badane kopolimery PED 30/70 wykazują znacznie mniejszy odsetek komórek apoptycznych w porównaniu z silikonem medycznym (rys. 6).

4. Wnioski

Nanostrukturalne elastomery termoplastyczne (TPE) zostały zsyntezowane i poddane napromienianiu dawką szybkich elektronów. Wyniki badań fizykochemicznych, strukturalnych i mechanicznych wskazują na obecność w tych elastomerach podwójnej sieci wiązań: fizycznych (natywnych, powstających podczas syntezy polimeru) i chemicznych (powstałych pod wpływem promieniowania jonizującego), wpływającej na polepszenie ich właściwości. Wysokie wskaźniki proliferacji komórek i niska śmiertelność (apoptoza), zwłaszcza w porównaniu z wynikami dla elastomeru silikonowego o jakości medycznej, pozwalają prognozować, że kopolimery poli(alifatyczno/aromatyczne-estry) (PED) będą bardzo obiecującymi materiałami do zastosowań w medycynie, jako na przykład elementy implantów tkanek miękkich.

Praca finansowana przez NCN (Grant nr: NN 507 47 18 38)

Literatura

1. Holden G., Kricheldorf H.R., Quirk R. „Thermoplastic Elastomers”, Carl Hanser Verlag, Munich, 2004.
2. El Fray M., Altstädt V., *Polymer* 2003, **44**, 4635.
3. Szycher M. „Polyurethane elastomers in medicine”, Marcel Dekker, New York, 1990.
4. El Fray M. „Nanostructured elastomeric biomaterials for soft tissue reconstruction”, Publishing House of the Warsaw University of Technology, Warszawa, 2003.
5. Prowans P., El Fray M., Słonecki J., *Biomaterials* 2002, **23**(14), 2973.
6. Renke-Głuszko M., El Fray M., *Biomaterials* 2004, **25**(21), 5191.
7. El Fray M., Słonecki J., *Angew. Mikromol. Chemie* 1996, **234**, 103.
8. El Fray M., Piątek M., G. Przybytniak G., *Elastomery* 2007, **11**, 1, 20.