

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

JOURNAL OF POLISH SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS AGH-UST
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

Number 118

Numer 118

Volume XVI

Rok XVI

JANUARY 2013

STYCZEŃ 2013

ISSN 1429-7248

PUBLISHER:

WYDAWCA:

**Polish Society
for Biomaterials
in Krakow**

Polskie
Stowarzyszenie
Biomateriałów
w Krakowie

**EDITORIAL
COMMITTEE:**

KOMITET
REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief

Redaktor naczelny
Jan Chłopek

Editor

Redaktor
Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial

Sekretarz redakcji
Design

Projekt
**Katarzyna Trała
Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF
EDITORIAL OFFICE:**

ADRES REDAKCJI:

AGH-UST

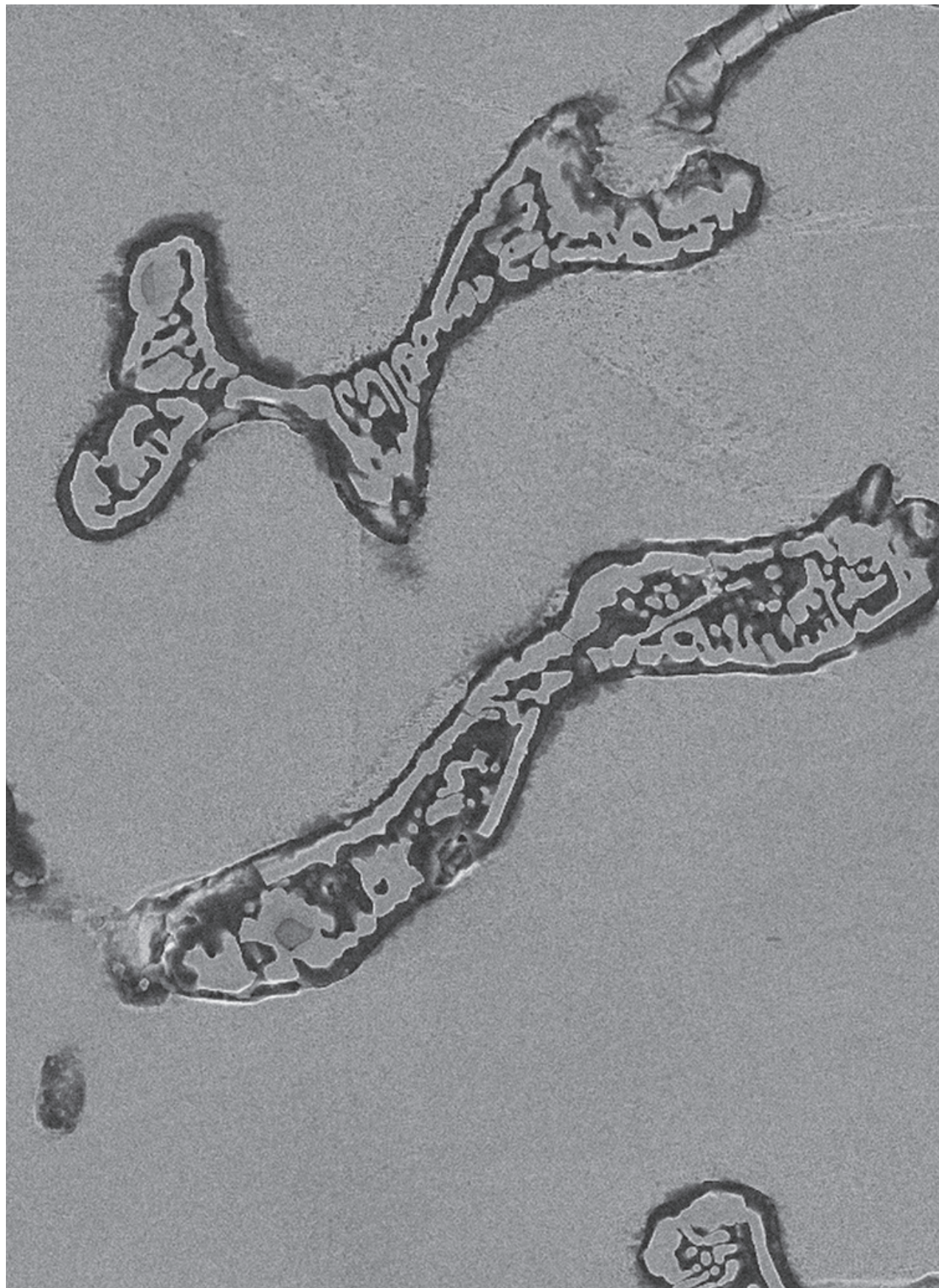
30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Krakow, Poland
Akademia
Górnictwo-Hutnicza
al. Mickiewicza 30/A-3
30-059 Kraków

Issue: 200 copies

Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe
AKAPIT
e-mail: wn@akapit.krakow.pl



INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD
MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac

UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

Lucie Bacakova

ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Romuald Będziński

POLITECHNIKA WROCLAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Marta Błażewicz

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

Stanisław Błażewicz

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

Maria Borczuch-Łączka

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

Wojciech Chrzanowski

UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Jan Ryszard Dąbrowski

POLITECHNIKA BIALOSTOCKA / BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

Matthias Epple

UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

Andrzej Górecki

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Robert Hurt

BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick

JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Wojciech Maria Kuś

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Małgorzata Lewandowska-Szumieł

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Jan Marciński

POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Sergey Mikhalovsky

UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura

POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

Roman Pampuch

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

Abhay Pandit

NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY

Stanisław Pielka

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCLAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

Vehid Salih

UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, UNITED KINGDOM

Jacek Składzień

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW / JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKOW

Andrei V. Stanishevsky

UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

Anna Ślósarczyk

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

Tadeusz Trzaska

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

Dimitris Tsipas

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcojęzycy obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
 - TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

Czasopismo
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48) 12 617 25 03, 12 617 25 61
tel./fax: (48) 12 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania manuskryptu oraz procedury recenzowania dostępne są na stronie internetowej czasopisma:
www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres:
apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48) 12 617 45 41
Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN
Konto:
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
ING Bank Śląski S.A. O/Kraków
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
4. A manuscript should be organized in the following order:
 - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words)
 - Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Address of editorial office:

Journal
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
AGH University of Science and Technology
Faculty of Materials Science and Ceramics
30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland

tel. (48) 12) 617 25 03, 12 617 25 61
tel./fax: (48) 12 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website:
www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates:
Cost of one number: 20 PLN
Payment should be made to:
Polish Society for Biomaterials
30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Krakow, Poland
ING Bank Slaski S.A.
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

*XXIII Conference on
BIOMATERIALS
IN MEDICINE
AND
VETERINARY
MEDICINE*

*10-13 October 2013
Hotel "Perła Południa"
Rytro, Poland*

www.biomat.agh.edu.pl



PAN
POLSKA AKADEMIA NAUK



SPIS TREŚCI

EVALUATION OF PCL AND PCL/n-HAp FIBRES PROCESSED BY MELT SPINNING IZABELLA RAJZER, JANUSZ FABIA, TADEUSZ GRACZYK, WOJCIECH PIEKARCZYK	2
PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH I MIKROSTRUKTURY STOMATOLOGICZNYCH STOPÓW KOBALTU I NIKLU PO ZASTOSOWANIU ZŁOMU POPRODUKCYJNEGO KAROLINA BEER, MARIUSZ WALCZAK	5
WIELOFUNKCYJNE BIOPOLIMEROWE SKAFOLDY JAKO IMPLANTY KOŚCI MARIA MUCHA, MICHAŁ TYLMAN	12
STERYLIZACJA RADIACYJNA BIORESORBOWALNYCH KOPOLIMERÓW ZAWIERAJĄCYCH LEK CYTOSTATYCZNY MONIKA MUSIAŁ-KULIK, KATARZYNA GĘBAROWSKA, HENRYK JANECEK, MAŁGORZATA PASTUSIAK, JANUSZ KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI	18
BADANIA WŁAŚCIWOŚCI TRIBOLOGICZNYCH I FIZYKOCHEMICZNYCH ŚLINY LUDZKIEJ I JEJ SUBSTYTUTÓW EDYTA ANDRYSEWICZ, JOANNA MYSTKOWSKA, JAN R. DĄBROWSKI, ELŻBIETA KRAWCZYK-DEMBICKA	23
ROLA POWIERZCHNI I STRUKTURY W POCZĄTKOWYM UWALNIANIU RYSPERYDONU Z MATRYC L-PLGA I D,L-PLGA ARTUR TUREK, JANUSZ KASPERCZYK, KATARZYNA JELONEK, PIOTR DOBRZYŃSKI, JOANNA WALICHIEWICZ, KATARZYNA KRZEMIŃSKA, ANNA SMOLA, MONIKA MUSIAŁ-KULIK, ANDRZEJ MARCINKOWSKI, MARCIN LIBERA, KATARZYNA GĘBAROWSKA, HENRYK JANECEK	30
OTRZYMYWANIE NOWYCH, WYSOKO-ELASTYCZNYCH I BIORESORBOWALNYCH KOPOLIMERÓW WĘGLANÓW ALIFATYCZNYCH MAŁGORZATA PASTUSIAK, PIOTR DOBRZYŃSKI, JANUSZ KASPERCZYK, ANNA SMOLA, MICHAŁ SOBOTA	37

CONTENTS

EVALUATION OF PCL AND PCL/n-HAp FIBRES PROCESSED BY MELT SPINNING IZABELLA RAJZER, JANUSZ FABIA, TADEUSZ GRACZYK, WOJCIECH PIEKARCZYK	2
COMPARISON OF MECHANICAL PROPERTIES AND MICROSTRUCTURE OF COBALT AND NICKEL DENTAL ALLOYS AFTER POST-PRODUCTION SCRAP APPLICATION KAROLINA BEER, MARIUSZ WALCZAK	5
MULTIFUNCTIONAL BIOPOLYMERIC SCAFFOLDS FOR BONE IMPLANTS MARIA MUCHA, MICHAŁ TYLMAN	12
RADIATION STERILIZATION OF BIORESORBABLE COPOLYMERS WITH THE CYTOSTATIC DRUG MONIKA MUSIAŁ-KULIK, KATARZYNA GĘBAROWSKA, HENRYK JANECEK, MAŁGORZATA PASTUSIAK, JANUSZ KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI	18
INVESTIGATIONS OF TRIBOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF HUMAN SALIVA AND ITS SUBSTITUTES EDYTA ANDRYSEWICZ, JOANNA MYSTKOWSKA, JAN R. DĄBROWSKI, ELŻBIETA KRAWCZYK-DEMBICKA	23
ROLE OF SURFACE AND STRUCTURE IN THE INITIAL RELEASE OF RISPERIDONE FROM L-PLGA AND D,L-PLGA MATRICES ARTUR TUREK, JANUSZ KASPERCZYK, KATARZYNA JELONEK, PIOTR DOBRZYŃSKI, JOANNA WALICHIEWICZ, KATARZYNA KRZEMIŃSKA, ANNA SMOLA, MONIKA MUSIAŁ-KULIK, ANDRZEJ MARCINKOWSKI, MARCIN LIBERA, KATARZYNA GĘBAROWSKA, HENRYK JANECEK	30
THE OBTAINING OF NEW HIGH ELASTIC BIORESORBABLE ALIPHATIC CARBONATE COPOLYMERS MAŁGORZATA PASTUSIAK, PIOTR DOBRZYŃSKI, JANUSZ KASPERCZYK, ANNA SMOLA, MICHAŁ SOBOTA	37

WERSJA PAPIEROWA CZASOPISMA „ENGINEERING OF BIOMATERIALS / INŻYNIERIA BIOMATERIALÓW” JEST JEGO WERSJĄ PIERWOTNĄ
 PRINTED VERSION OF „ENGINEERING OF BIOMATERIALS / INŻYNIERIA BIOMATERIALÓW” IS A PRIMARY VERSION OF THE JOURNAL

EVALUATION OF PCL AND PCL/n-HAp FIBRES PROCESSED BY MELT SPINNING

IZABELLA RAJZER¹, JANUSZ FABIA¹, TADEUSZ GRACZYK¹,
WOJCIECH PIEKARCZYK²

¹ ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,
FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES,
INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER MATERIALS,
2 WILLOWA ST., 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND

² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

* E-MAIL: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

Abstract

In this work the process for the manufacture of polycaprolactone fibres containing hydroxyapatite nanoparticles by melt spinning method was developed. The effect of nanohydroxyapatite content on the fibre structure and properties was investigated with FTIR, SEM, DSC, TGA methods. The mechanical properties of obtained fibres enable further processing to scaffolds by nonwoven technologies.

Keywords: PCL fibres, melt spinning, scaffolds, bone, tissue engineering

[*Engineering of Biomaterials 118 (2013) 2-4*]

Introduction

Composite fibres comprising a biodegradable polymeric matrix with bioactive fillers show considerable promise in the field of tissue engineering, potentially as nonwoven scaffold for bone regeneration.

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a biodegradable, semicrystalline aliphatic polyester which has been regarded as non-toxic and tissue compatible and was approved after extensive testing by the US Food and Drug Administration (FDA) to produce a number of medical and drug devices [1-2]. PCL can be transformed by melt spinning into fibers for subsequent fabrication of three dimensional scaffolds for bone tissue engineering applications. Unfortunately, PCL has an intrinsic hydrophobic chemical nature, and its poor interaction with biological fluids unables cells adhesion and proliferation [3-4]. Incorporation of synthetic nano-hydroxyapatite (n-HAp) into the fibrous polymer matrix can enhance biological properties (such as bioactivity) of the scaffold. Bioactive material in biological environment should be covered with apatite, similar to the natural one present in bones, which allows for bonding of biomaterial with bone. It is believed that the appearing of apatite on the implant surface (the process known as bioactivity) is leading to the formation of chemical bonds at the implant - bone interface [5-6]. It has been proven that the HAp, promotes osteoblast adhesion, differentiation and proliferation, osteointegration and deposition of calcium-containing minerals on its surface, which lead to enhanced formation of new bone tissue within a short period of time [7].

The aim of the present study is to develop a process for the manufacture of polycaprolactone fibres containing hydroxyapatite nanoparticles, as well as to assess the effect of hydroxyapatite content on the fibre structure and properties.

Materials and Methods

Fibre production

Polycaprolactone (Sigma-Aldrich) having a molecular weight of 70 000 - 90 000 g/mol was used in the study. Nano-hydroxyapatite was produced at the AGH-UST (Krakow, Poland). An average size of the n-HAp particles was 23 nm. PCL/n-HAp fibres were extruded from the melt using a prototype laboratory spinning machine PROMA (Torun, Poland). The applied forming equipment was a one-screw and one-headed extruder with an electric heating system. Its mass cylinder consist of two heating zones: supplying and mixing, respectively. The screw of the extruder has a characteristic roll shape crown of a cone enabling an effective process of mixing the components in the melt. Screw parameters are: diameter $D_1=55$ mm and $D_2=21$ mm, length $L=245$ mm. A polymer melt is pressed from the extruder to the spinning head equipped with a separate heating circuit, a passing-screw ($D_p=55$ mm, $L=110$ mm) and an exchangeable spinning die. Fibres were extruded from the melt with a temperature of 170°C and were spun with a take up velocity of 247 m/min. Nano-hydroxyapatite (5 w/w%) was added to the polymer powder before melting. The receiving of masterbatch of PCL/n-HAp, before the principal process of forming fibers was applied. The other parameters of the process of forming: rotation of the extruder screw and passer 9 and 10 rpm, respectively.

Methods

The surface morphology of the composite fibres was examined using scanning electron microscopy (SEM, Jeol JSM 5500). The average fibers' diameter was estimated from the SEM images. Chemical characteristics of the fibres were evaluated by FTIR method using spectrophotometer Nicolet 6700. The spectra were recorded at the range of 400-4000 cm^{-1} using at least 64 scans and 4 cm^{-1} resolution. The mechanical properties of electrospun samples were measured by uniaxial testing machine (Zwick-Roell Z 2.5.). All tensile tests were done on single fibre samples. The individual fibres were mounted on paper tabs, with a central cut-out that gave a gauge length of about 25 mm. The tab was gripped in the jaws of the testing machine and, prior to testing, cuts were made from each side to the central cut-out.

Thermal properties of studied fibres were estimated by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetric Analysis (TGA) methods. Calorimetric investigations were carried out on a TA Instruments Thermal Analysis System 5100 equipped with a MDSC Calorimeter 2920 at following conditions: heating rate 10°C/min, nitrogen gas flow (40 ml/min), temperature up to 300°C. Thermogravimetric measurements were done using TA Instruments Q 500 TGA Analyzer up to 800°C at the other conditions mentioned above. The thermograms were evaluated by means of the Universal V2.6D (TA Instruments) software.

Results and Discussion

The microstructures of the pure PCL and n-HAp modified PCL fibres (PCL/n-HAp), produced by melt spinning process, are presented in FIG. 1. Hydroxyapatite agglomerates are clearly visible on the surface of the PCL/n-HAp fibres (FIG. 1b). The distribution of fibres diameter is shown in FIG. 1c. Polycaprolactone fibre diameter is in the range of 28-53 μm , while the calculated average diameter for the PCL fibres is $35.6 \pm 10 \mu\text{m}$. In the case of composite fibers, the PCL/n-HAp fiber diameter is in the range of 19-53 μm and average diameter is slightly smaller ($31.4 \pm 7 \mu\text{m}$). FTIR spectra recorded for PCL, PCL/n-HAp and n-HAp samples are presented in FIG. 1d.

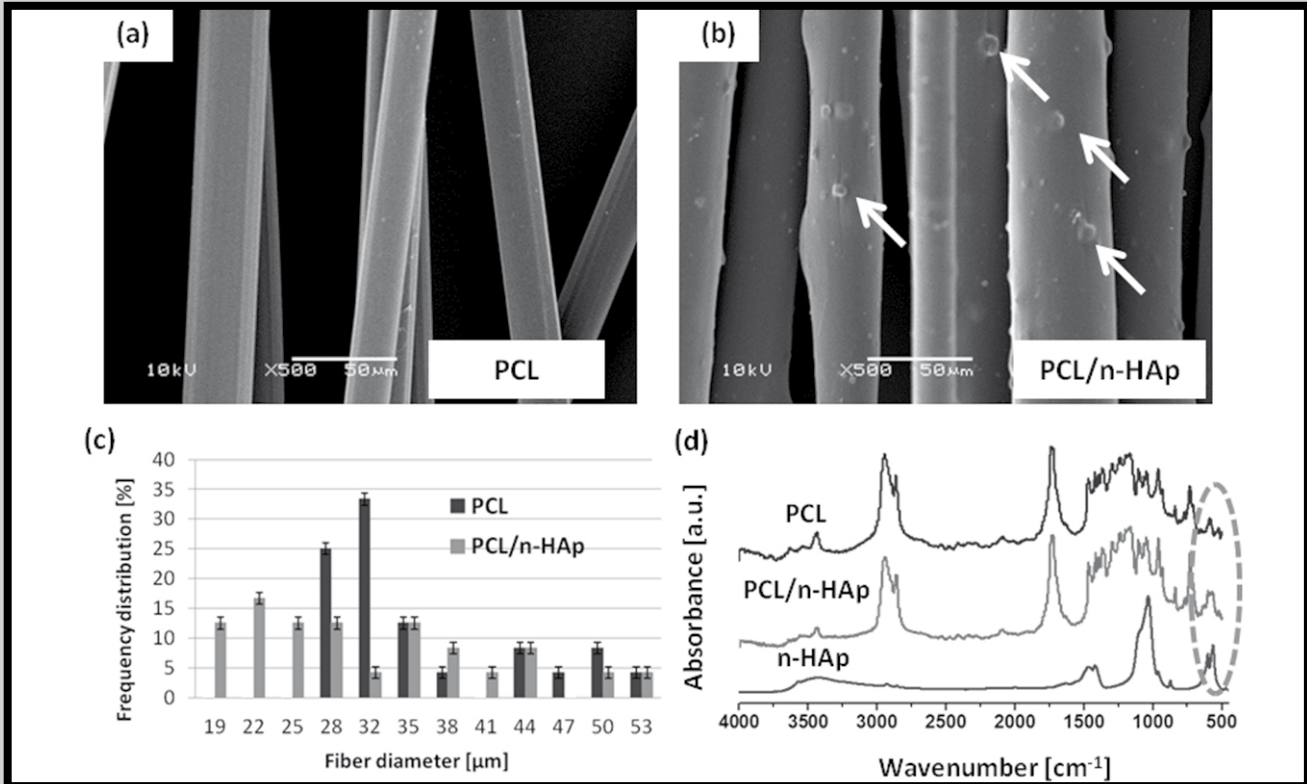


FIG. 1. Microstructure of (a) polycaprolactone fibres (PCL); (b) polycaprolactone fibres modified with hydroxyapatite (PCL/n-HAp); (c) Fiber diameter distribution for PCL and PCL/n-HAp fibers; (d) The comparison of FTIR spectra of PCL, PCL/n-HAp and n-HAp samples.

The most important characteristic bands for polycaprolactone are shown in TABLE 1. FTIR analysis confirmed apatite presence in the PCL matrix. Typical force-elongation curves for the PCL and PCL/n-HAp fibers are presented in FIG. 2a,b. The highest value of tensile force (0.24 N) was observed in the case of pure PCL fibres whereas the largest elongation (about 220 mm) was observed in the case of composite fibres (PCL/n-HAp). Tensile strength for both samples is similar (FIG. 2c). The mechanical properties of obtained fibres enable further processing to scaffolds by nonwoven technologies. DSC investigations revealed the quite good thermal stability of PCL melt irrespective of modification with n-HAp up to 300°C and the distinct decrease of the melting enthalpy value in the case of fibres with n-HAp in respect to PCL fibres without the modifier (FIG. 3). The results of TGA measurements showed one-stage thermal decomposition of PCL and PCL/n-HAp fibres with the maximum at 401°C (FIG. 4).

TABLE 1. Assignment of FTIR bands for polycaprolactone.

Wavenumber [cm ⁻¹]	Type of vibration
2949	CH ₂ , asymmetric, stretching
2865	CH ₂ , asymmetric, stretching
1727	C=O, stretching
1293	C-O, C-C, stretching
1240	C-O-C, asymmetric, stretching
1175	C-O-C, symmetric, stretching
1157	C-O, C-C, stretching

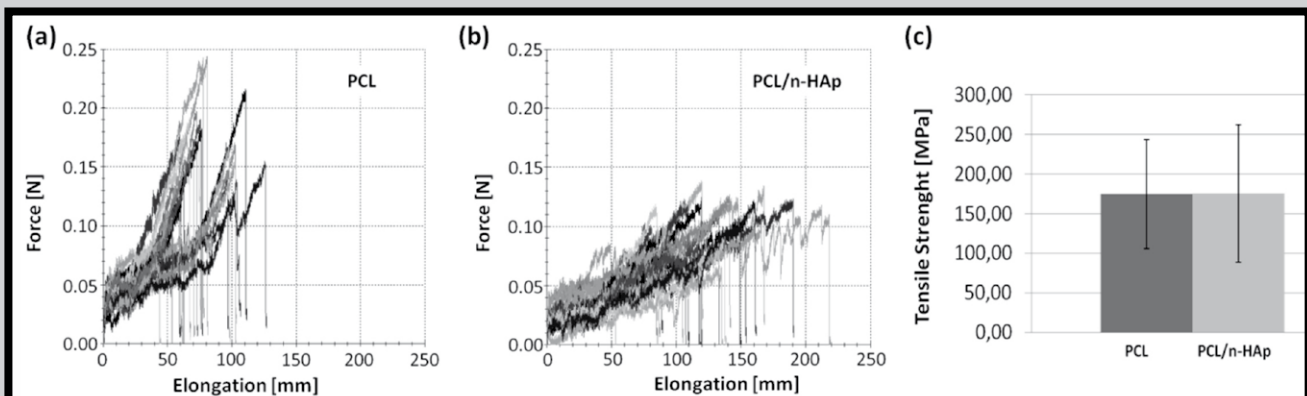


FIG. 2. (a-b) Force-elongation curves obtained from tensile tests performed on melt spun PCL and PCL/n-HAp fibers; (c) Tensile strength of melt spun fibers.

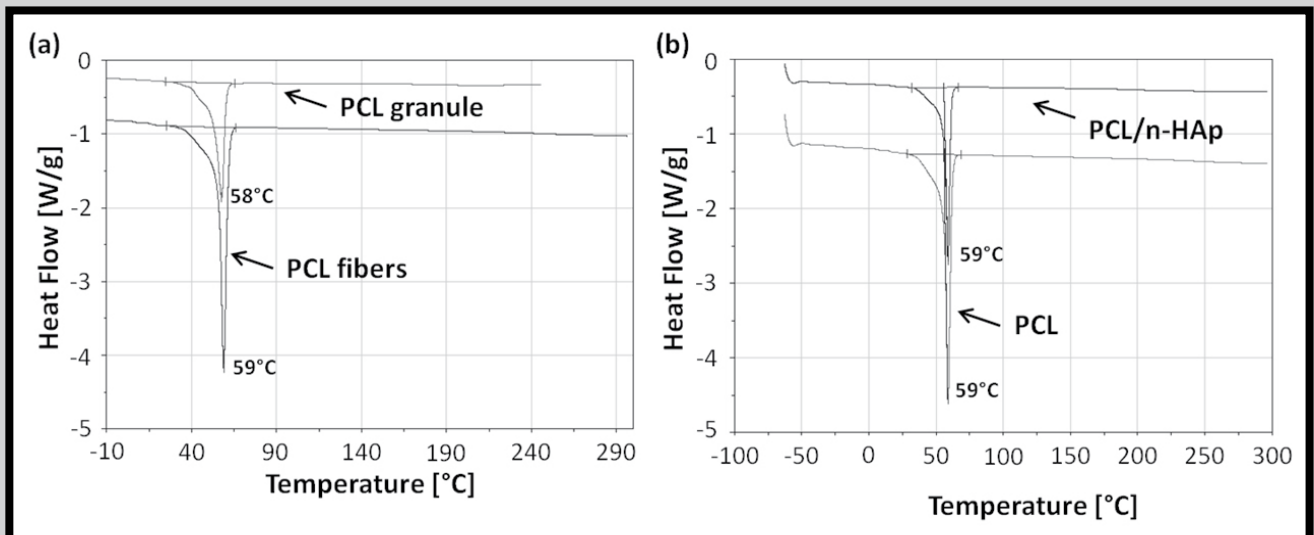


FIG. 3. DSC thermograms of (a) PCL granule and PCL fibers; (b) PCL and PCL/n-HAp fibers.

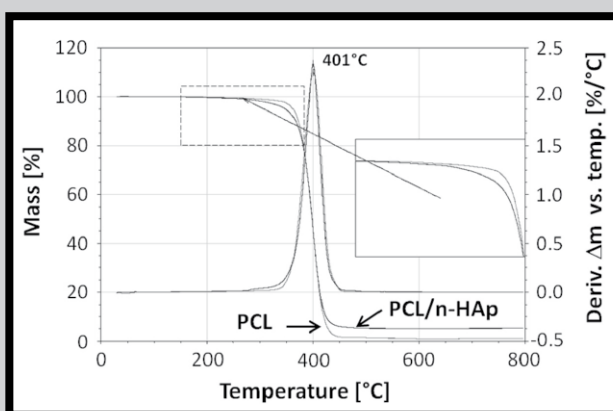


FIG. 4. TGA curves of melt spun PCL and PCL/n-HAp fibers.

Conclusion

The results obtained in this paper indicated that incorporation of the n-HAp particles in the polymer matrix during melt spinning process induced interesting changes in the material surface morphology. SEM observations and FTIR analysis may possibly suggest the presence of an apatite on the surface of fibres. The mechanical properties of obtained fibres enable further processing to scaffolds by nonwoven technologies. Our preliminary study suggests that the PCL/n-HAp fibres may be potentially useful in tissue engineering applications, particularly as three dimensional substrates for bone growth.

Acknowledgments

This work was supported by the Minister of Science and Higher Education; project number N N507 550938.

References

- [1] Nirmala R., Nam K.T., Park D.K., Woo-il B., Navamathavan R., Kim H.Y.: Structural, thermal, mechanical bioactivity evaluation of silver-loaded bovine bone hydroxyapatite grafted poly(ϵ -caprolactone) nanofibers via electrospinning. *Surface & Coatings Technology* 205 (2010) 174-181.
- [2] Woodruff M.A., Hutmacher D.W.: The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 1217-1256.
- [3] Fabbri P., Bondioli F., Messori M., Bartoli C., Dinucci D., Chiellini F.: Porous scaffolds of polycaprolactone reinforced with in situ generated hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010) 343-351.
- [4] Bianco A., Federico E.D., Moscatelli I., Camaioni A., Armentano I., Campagnolo L., Dottori M., Kenny J.M., Siracusa G., Gusmano G.: Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/Ca-deficient hydroxyapatite nanohybrids: Microstructure, mechanical properties and cell response by murine embryonic stem cells. *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 2063-2071.
- [5] Barrere F., Mahmoode T.A., de Groot K., van Blitterswijk C.A.: Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering R* 59 (2008) 38-71.
- [6] Rajzer I., Kwiatkowski R., Piekarczyk W., Biniś W., Janicki J.: Carbon nanofibers produced from modified electrospun PAN/hydroxyapatite precursors as scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 32 (2012) 2562-2569.
- [7] Rajzer I., Menszek E., Bacakova L., Rom M., Błażewicz M.: In vitro and in vivo studies on biocompatibility of carbon fibres. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010) 2611-2622.

PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH I MIKROSTRUKTURY STOMATOLOGICZNYCH STOPÓW KOBALTU I NIKLU PO ZASTOSOWANIU ZŁOMU POPRODUKCYJNEGO

KAROLINA BEER*, MARIUSZ WALCZAK

POLITECHNIKA LUBELSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,
KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ
UL. NADBYSTRZYCKA 36, 20-618 LUBLIN
* E-MAIL: KAROLINA.BEER@GMAIL.COM

Streszczenie

Celem pracy było dokonanie analizy wpływu ilości materiału przetapianego wtórnie dodanego do fabrycznie nowego stopu na właściwości mechaniczne i mikrostrukturę stopów stomatologicznych CoCrMo oraz NiCrMo. Stopy te wykorzystywane są w stomatologii do wytwarzania podbudów metalowych protez częściowych. Ze względów ekonomicznych większość laboratoriów protetycznych korzysta z tzw. złomu poprodukcyjnego jako części wsadu do kolejnego procesu odlewania protez. Złom ten stanowić mogą metale lub ich stopy, które były już raz użyte w procesie odlewania, jak również pozostałości po obróbce protetycznej. Doniesienia literaturowe wskazują, iż procedura ta może powodować zmianę właściwości mechanicznych i mikrostrukturalnych uzyskanych odlewów i wpływać na końcową jakość wytworzonych protez. Praca ta powstała w odpowiedzi na problem uzyskiwania różnych wyników przez badaczy.

Jako próbki do badań zastosowano jednokrotne przetopy stopu kobaltu i niklu o zawartości wyjściowej odpowiednio: 100, 50, 25% stopu fabrycznego oraz technologię odlewania odśrodkowego.

Wykonano próbę zginania, pomiar makrotwardości oraz badania mikrostruktury. Dla badanych stopów zaobserwowano zmianę badanych właściwości mechanicznych, w zależności od udziału odpadów poprodukcyjnych. Zidentyfikowano typy faz występujące w strukturze badanych stopów.

Słowa kluczowe: stopy kobaltu, stopy niklu, biomateriały, złom poprodukcyjny, twardość, węgliki

[Inżynieria Biomateriałów 118 (2013) 5-11]

Wprowadzenie

Biomateriały metalowe w tym stopy odlewnicze przez szereg lat stosowane były w protetyce stomatologicznej. Stopy metali nieszlachetnych ze względu na niższą cenę wyparły popularne niegdyś stopy złota. Pomimo pojawienia się doniesień naukowych o szkodliwym wpływie niektórych metali na organizmy żywe, z powodu braku niemetalo- wych materiałów zastępczych, wykazujących podobne właściwości wytrzymałościowe i spełniających wymagane kryteria technologiczne oraz ekonomiczne, nadal zachodzi konieczność implantowania elementów ze stopów metali, wykonanych w całości lub części.

COMPARISON OF MECHANICAL PROPERTIES AND MICRO-STRUCTURE OF COBALT AND NICKEL DENTAL ALLOYS AFTER POST-PRODUCTION SCRAP APPLICATION

KAROLINA BEER*, MARIUSZ WALCZAK

LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
MECHANICAL ENGINEERING FACULTY,
DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE
UL. NADBYSTRZYCKA 36, 20-618 LUBLIN, POLAND
* E-MAIL: KAROLINA.BEER@GMAIL.COM

Summary

The aim of this study was to analyze the impact of the amount of remelted material added to the new alloy on mechanical properties and microstructure of CoCrMo and NiCrMo dental alloys. These alloys are used to manufacture the metal partial frameworks of the dental prostheses. For economic reasons, most dental laboratories use a post-production scrap as part of the batch for the next process of casting dentures. This scrap are metals or their alloys, which have already been used once in the casting process, as well as the residues after prosthetic treatment. Literature reports suggest that this procedure affects the mechanical and structural properties and could affect the quality of the final prosthesis. This work was created in response to the problem of getting different results by the researchers.

As the test sample disposable cobalt and nickel alloys were used with a starting composition: 100, 50, 25% of the brand new material and centrifugal casting technology was applied.

Bending test as well as macrohardness test and microstructural analysis were performed. For tested castings changes of the mechanical properties were noticed depending on the amount of postproduction scrap in castings. The types of phases occurring in the alloys microstructures were also identified.

Keywords: cobalt alloys, nickel alloys, biomaterials, post-production scrap, hardness, carbides

[Engineering of Biomaterials 118 (2013) 5-11]

Introduction

Biomaterials including metal casting alloys for many years were used in prosthetic dentistry. Base metal alloys due to lower prices displaced the formerly popular gold alloys. Despite the of scientific reports about the harmful effects of certain metals on living organisms and, due to lack of non-metallic material substitution, exhibiting similar mechanical properties and meeting the required technological and economic criteria, there is still a need to implant elements in whole or in part made of metal alloys.

Despite the development of implants, fixed partial denture: a crown, bridge or skeletal denture, remains one of the most functional and economical restorations in Poland [1].

Mimo rozwoju implantów, protezy częściowe stałe typu korona, most czy też proteza szkieletowa pozostają jednymi z najbardziej funkcjonalnych i ekonomicznych uzupełnień protetycznych w Polsce [1].

Podbudowy metalowe tych protez odlewane są powszechnie ze stopów na osnowie niklu (korony, mosty stomatologiczne), protezy szkieletowe natomiast wykonuje się głównie ze stopów na osnowie kobaltu.

Niepowodzenia kliniczne w przypadku odlewanych protez częściowych wynikają przede wszystkim z braku poprawności i precyzji projektowania uzupełnienia (głównie w przypadku protez szkieletowych) oraz zaniedbania procedur laboratoryjnych takich jak: technika wytapiania i odlewania. Dane literaturowe oraz praktyka lekarzy stomatologów wskazują również, że na jakość uzupełnień protetycznych może wpływać stosowanie do odlewania materiałów powtórnie przetopionych [2-10]. Wykorzystywanie tzw. złomu poprodukcyjnego to częsta praktyka obniżająca koszty w pracowniach protetycznych. Materiał z „recyklingu” stanowiącym mogą zarówno metale lub ich stopy, które już raz były użyte w procesie odlewania (np. elementy układu wlewowego), jak i pozostałości po obróbce protetycznej. Zdania producentów i naukowców w tej sprawie są jednak podzielone. Wielu producentów stopów dentystycznych dopuszcza stosowanie przetopów wtórnych, z udziałem co najmniej 50% materiału nowego i z zastrzeżeniem, że odpady poprodukcyjne pochodzą z tej samej partii. Istnieje też grupa producentów, która nie dopuszcza materiałów powtórnie przetopionych, bądź nie podaje żadnych informacji dotyczących wykorzystania stopów dentystycznych uzyskanych z recyklingu.

Raporty naukowe wskazują, iż właściwości ponownie przetopionych stopów mogą wykazywać pewne różnice w stosunku do stopów fabrycznie nowych, co spowodowane jest zmianą składu chemicznego i mikrostruktury. Jak dotąd brak jest jednoznacznej opinii wśród autorów prac badawczych prezentowanych w literaturze [7-11].

Istnieje także grupa naukowców podkreślająca niekorzystny wpływ stosowania ponownych przetopień na odporność korozyjną nowopowstałych stopów oraz obniżenie wytrzymałości połączenia metal-porcelana dentystyczna po zastosowaniu odlewów zawierających przetopy wtórne [12-16]. Większość autorów publikacji formułując jedynie wnioski praktyczne, wiąże technologię z właściwościami mechanicznymi i nie opisuje zjawisk fizycznych wywołujących zmiany właściwości stopów z dodatkiem przetopów wtórnych. W pracy przedstawiono wyniki badań porównawczych mikrostruktury i wybranych właściwości mechanicznych stopów kobaltu i niklu z udziałem złomu poprodukcyjnego.

Materiały i metody

Do badań zastosowano dwa stopy stomatologiczne:

1. Stop na osnowie kobaltu: Wironit extra-hard firmy Bego o nominalnym składzie chemicznym (masowo) 63% Co, 30% Cr, 5% Mo, 1,1% Si oraz Mn<1% i C<1% [17]. Stop ten przeznaczony jest do odlewania protez szkieletowych, protez kłamrowych i protez mocowanych na zasuwy, rygle i zatrzaski.

2. Stop na osnowie niklu: Heraenium NA o nominalnym składzie chemicznym (masowo) Ni-59,3%, Cr-24%, Mo-10%, Fe-1,5%, Mn-1,5%, Ta-1,5%, Si-1,2%, Nb-1,0% [18]. Stop ten przeznaczony jest do odlewania koron i mostów, licoanych ceramiką, kompozytem lub akrylem.

Ze stopu CoCrMo i NiCrMo wykonano odlewy stosując jednokrotne przetopy o składzie wyjściowym odpowiednio 100, 50, 25% stopu fabrycznego. Formy ceramiczne wykonano metodą wytapianych modeli.

Metal substructure of these prostheses are generally cast on nickel alloys (crowns, dental bridges), while the skeletal dentures are mainly made on the cobalt alloys.

Clinical failures in the case of cast partial dentures are mainly due to the lack of accuracy and precision design of this restoration (above all in partial dentures) and neglect of laboratory procedures such as melting and casting technique. Literature data and practice dentists also indicate that the quality of the restorations may affect the use of recycled materials for casting [2-10]. The use of post-production scrap is a common practice of decreasing costs in the prosthetics laboratories. The material of the “recycling” can be either metals or their alloys, which had already been used in the casting process (for example: elements of casting gating system) and the residues after prosthetic treatment. However producers and researchers opinions in this case are divided. Many manufacturers of dental alloys allows the use of once remelted alloys secondary, but not less than with 50% addition of the new material and they provide that the material must come from the same batch. There is also a group of manufacturers that do not allow remelted material, or does not provide any information on the use of dental alloys obtained from recycling.

Scientific reports indicate that the properties of the remelted alloys may show some differences in relation to the brand new alloys, what is caused by changing of the chemical composition and microstructure. However, no clear opinion of the authors of the research was presented in the literature [7-11].

According to [12-14] remelting may results in lower mechanical properties and corrosion resistance. Moreover authors [15,16] indicate a decrease of strength of the metal - dental porcelain bond after using casts containing remelted materials. Most scientists formulating only practical conclusions combine applications of technology with mechanical properties and they do not describe the physical phenomena that cause changes in the properties of alloys with addition of post-production scrap. In this work the results of comparative studies of the microstructure and selected mechanical properties of cobalt and nickel matrix alloys with addition of post-production scrap were presented.

Materials and Methods

For the study two dental alloys were used:

1. The cobalt matrix alloy: Wironit extra-hard (Bego); a nominal composition (by mass) 63% Co, 30% Cr, 5% Mo, 1.1% Si and Mn <1% C <1% [17]. This alloy is used for casting partial dentures, clamp dentures and dentures mounted on bolts and fasteners.

2. The nickel matrix alloy: Heraenium NA; a nominal composition (by mass) of Ni-59.3%, Cr-24%, Mo-10%, Fe-1.5%, Mn-1.5%, Ta-1.5%, Si-1.2%, Nb-1.0% [18]. This alloy is used for casting crowns, bridges, facing by ceramic, composite or acrylic.

The castings were made from the CoCrMo and NiCrMo alloy using a disposable alloy with a starting output composition of 100, 50, 25% of brand new material. Ceramic forms were made using melted models method.

Casting was performed using a centrifugal casting induction foundry - ROTOCAST of Roko Dental Equipment using ceramic crucibles. After removing the ceramic investment material and cutting off the material from the gating system the surface of samples was blasted. The whole process of implementation of the samples was carried out in a professional dental laboratory according to procedures used in the manufacture of metal partial dentures.

Odlewy wykonano przy użyciu odśrodkowej odlewarki indukcyjnej ROTOCAST firmy Roko Dental Equipment stosując tygle ceramiczne. Po usunięciu skorupy ceramicznej i odcięciu elementów układu wlewowego powierzchnię próbek piaskowano. Cały proces wykonania próbek przeprowadzony był w warunkach profesjonalnej pracowni protetycznej według procedur stosowanych do wytwarzania podbudów protez częściowych.

Pomiary twardości wykonano na zglądach poprzecznych i wzdłużnych przy użyciu twardościomierza Vickersa FV-700 z automatycznym systemem ARS 900 firmy Future - Tech Corp i przy obciążeniu 98,07 N. Dla każdego wytopu wykonano 20 pomiarów.

Próbie zginania trzypunktowego wykonano na maszynie wytrzymałościowej Zwick Z100, wyposażonej w głowicę pomiarową 500 N. Próbki miały postać prostopadłościennych płytek o wymiarach 25×3×0,6 mm. Próby zginania przeprowadzono na 8 próbkach z każdego wytopu. Odległość między podporami wynosiła 20 mm, a średnica wałeczków podpierających próbkę wynosiła 2 mm. Badania realizowano z posuwem 1,5 mm/min. Mikrostrukturę zglądów obserwowano przy użyciu mikroskopu optycznego Nikon MA200 jak również skaningowego mikroskopu elektronowego Carl Zeiss Ultra Plus. Zglądy trawione były wodą królewską.

Wyniki i dyskusja

Twardość HV10 próbek wykonanych ze stopu Wironit osiąga wartość średnią 380, czyli nieco wyższą od 375, deklarowaną przez producenta. Dla stopu Heraenium NA, wartości te wynoszą odpowiednio 210 i 185. Wartość odchylenia standardowego - dla stopu Wironit extra-hard nie przekracza 4,5%, natomiast dla stopu Heraenium NA nie przekracza 3,55%. Porównanie wyżej omówionych wyników przedstawia RYS. 1. Za pomocą testu Lillieforsa i testu W Shapiro-Wilka wykazano, iż nie ma podstaw do odrzucenia normalności rozkładów - prawdopodobieństwo testowe p jest większe od przyjętego poziomu istotności $\alpha=0,05$. Test – T dla prób zależnych wykonany programem STATISTICA firmy StatSoft pokazuje znaczące różnice pomiędzy grupami próbek wykonanych z zawartością 100% i 50%, stopu fabrycznego, zarówno dla stopu Wironit i Heraenium NA. Istotne różnice wykazano również pomiędzy grupami próbek, z udziałem 50% a 25% fabrycznego stopu Heraenium NA ($p<0,05$).

Wyniki pomiarów wytrzymałości na zginanie przedstawiono na RYS. 2 oraz w TABELI 1. W przypadku stopu Wironit najwyższą wytrzymałość stwierdzono dla stopu fabrycznego. Dodatek złomu poprodukcyjnego powoduje obniżenie tej wytrzymałości (o około 7,2% dla materiału zawierającego 50% stopu fabrycznego i o około 4,8% dla materiału zawierającego 25% stopu fabrycznego). W przypadku stopu Heraenium NA zauważono tendencję odwrotną. Dodatek złomu poprodukcyjnego powoduje zwiększenie wytrzymałości na zginanie (o około 11,3% dla materiału zawierającego 50% stopu fabrycznego i o około 18,4% dla materiału zawierającego 25% stopu fabrycznego). Analizując odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności, oba badane stopy wykazują wzrost zmienności wyników wraz z rosnącym udziałem złomu poprodukcyjnego w stopie, za wyjątkiem przypadku: 25% materiału fabrycznego dla stopu Heraenium NA. Może być to spowodowane pewnymi trudnościami wykonania powtarzalnych elementów z większym udziałem złomu poprodukcyjnego, będącymi przyczyną np. wad odlewniczych. Stwierdzenie to wymaga jednak weryfikacji poprzez badania rentgenowskie.

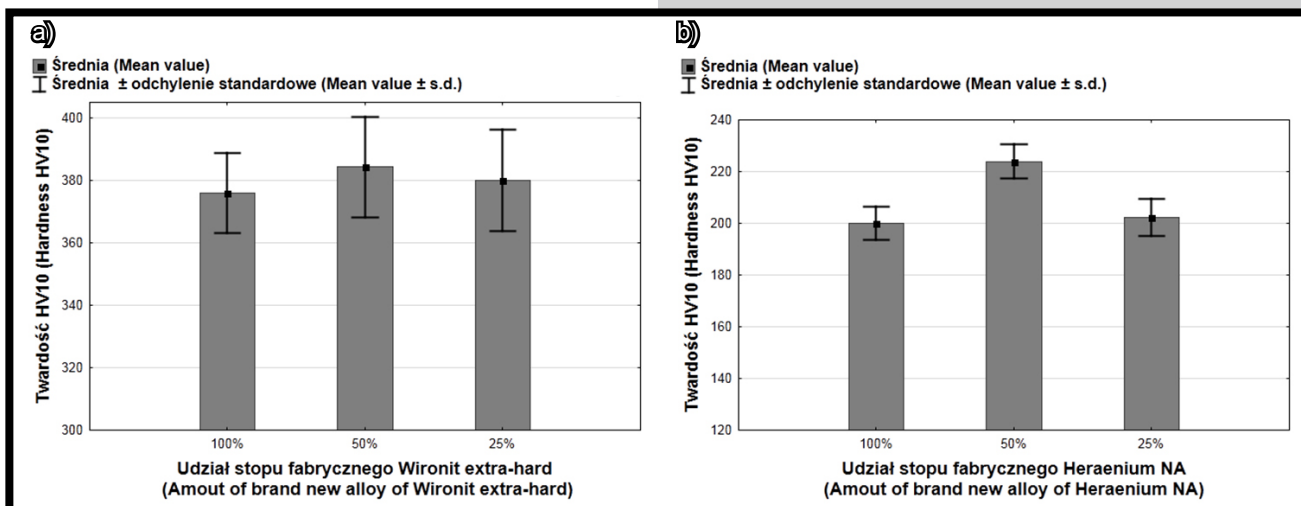
Hardness measurements were performed on Vickers hardness tester FV-700 with automatic ARS 900 system from Future - Tech Corp., at a load of 98.07 N for transverse and longitudinal specimens. The 20 hardness measurements for each melt were performed.

Three-point bending test was performed on a Zwick Z100 machine equipped with a 500 N measuring head. Samples were in the form of rectangular plates with dimensions of 25×3×0.6 mm. For bending tests 8 items for each type of melt were used. The distance between the supports was 20 mm, and the diameter of the rollers supporting the sample was 2 mm. The study was conducted at the feed rate of 1.5 mm/min. Microstructure of the specimens was observed using an optical microscope Nikon MA200 as well as scanning electron microscope Carl Zeiss Ultra Plus. Metallographic specimens were etched by aqua regia.

Results and Discussion

The hardness HV10 of the samples made from both alloys reaches an average value slightly higher (380) than it the one declared by the manufacturer - 375 for Wironit extra-hard alloy and (210) 185 for Heraenium NA alloy. Standard deviation for Wironit extra-hard alloy does not exceed 4.5%, while for the alloy Heraenium NA does not exceed 3.55%. Comparison of the results is shown in FIG. 1. Using the Lilliefos and Shapiro-Wilk test, it was shown that there is no reason to reject the normal distribution - the probability test p is greater than the accepted level of significance $\alpha = 0.05$. T-Test for dependent samples, made using STATISTICA program from StatSoft Company, shows significant differences between the groups of samples made of a material containing 100% of the new alloy and the samples containing 50% of a brand new alloy for Wironit extra-hard as well as for Heraenium NA. Significant differences were also found between the groups of samples of 50% and 25% of the brand new alloy Heraenium NA ($p<0.05$).

Results of bending strength tests are shown in FIG. 2 and TABLE 1. For Wironit extra-hard alloy the highest value (of bending strength) was found for the samples made of the brand new alloy. The decrease of this value in the case of samples containing 50% and 25% of brand new alloy was observed (for 50% of brand new alloy at the level 7.2% and for 25% of brand new alloy at the level 4.8%). In the case of Heraenium NA the opposite tendency was observed. Addition of the post-production scrap increases the bending strength (for 50% of brand new alloy in the range 11.3% and for 25% of brand new alloy about 18.4%). Analyzing the standard deviation and coefficient of variation, both tested alloys show an increase in variability with increasing participation in post-production scrap rate, except for the case of 25% of the brand new material for the Heraenium NA alloy. It may be due to some difficulties in manufacturing repeatable elements containing higher proportion of post-production scrap, which are the cause of for example casting defects. This statement, however, requires verification by X-rays study.

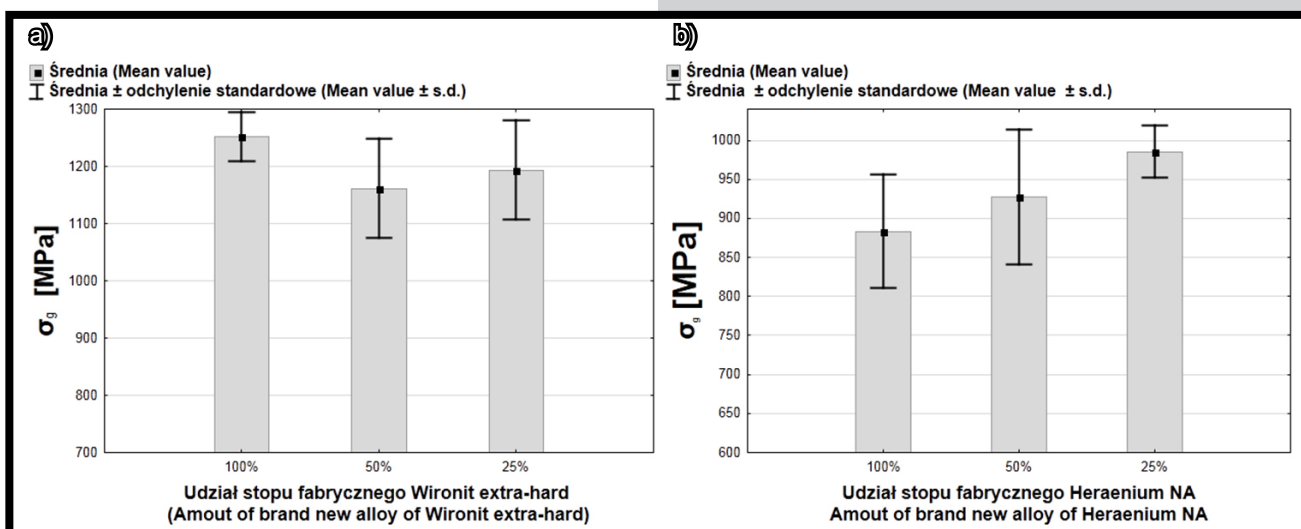


RYS. 1. Porównanie wartości twardości stopów z różnym udziałem procentowym nowego stopu:

a) Wironit extra-hard, b) Heraenium NA.

FIG. 1. Comparison of hardness of the alloys with different percentage amount of new alloy:

a) Wironit extra-hard, b) Heraenium NA.



RYS. 2. Porównanie wartości średnich naprężeń zginających $\overline{\sigma_g}$ w zależności od udziału w odlewach nowego stopu: a) Wironit extra-hard, b) Heraenium NA

FIG. 2. Comparison of the average bending stress $\overline{\sigma_g}$ depending on participation of the new alloy in castings:

a) Wironit extra-hard alloy, b) Heraenium NA alloy.

TABELA 1. Porównanie odchylenia standardowego oraz współczynnika zmienności dla średnich naprężeń zginających badanych stopów (Wironit extra-hard i Heraenium NA) w zależności od udziału w odlewach nowego stopu.
TABLE 1. Comparison of the standard deviation and coefficient of variation for the average bending stress of tested alloys (Wironit extra-hard and Heraenium NA), depending on the participation of the brand new alloy in castings.

	Udział materiału „nowego” w odlewie dla badanych stopów: Wironit extra-hard oraz Heraenium NA Amount of „new” material in cast for the tested alloys: Wironit extra-hard and Heraenium NA					
	100%		50%		25%	
	Wironit extra-hard	Heraenium NA	Wironit extra-hard	Heraenium NA	Wironit extra-hard	Heraenium NA
$\overline{\sigma_g}$ [MPa]	1250	833	1160	927	1190	986
Odchylenie standardowe Standard deviation [MPa]	45.6	72.6	82.7	86.5	88.1	33.3
Współczynnik zmienności Relative standard deviation	3.66	8.2	7.15	9.3	7.38	3.4

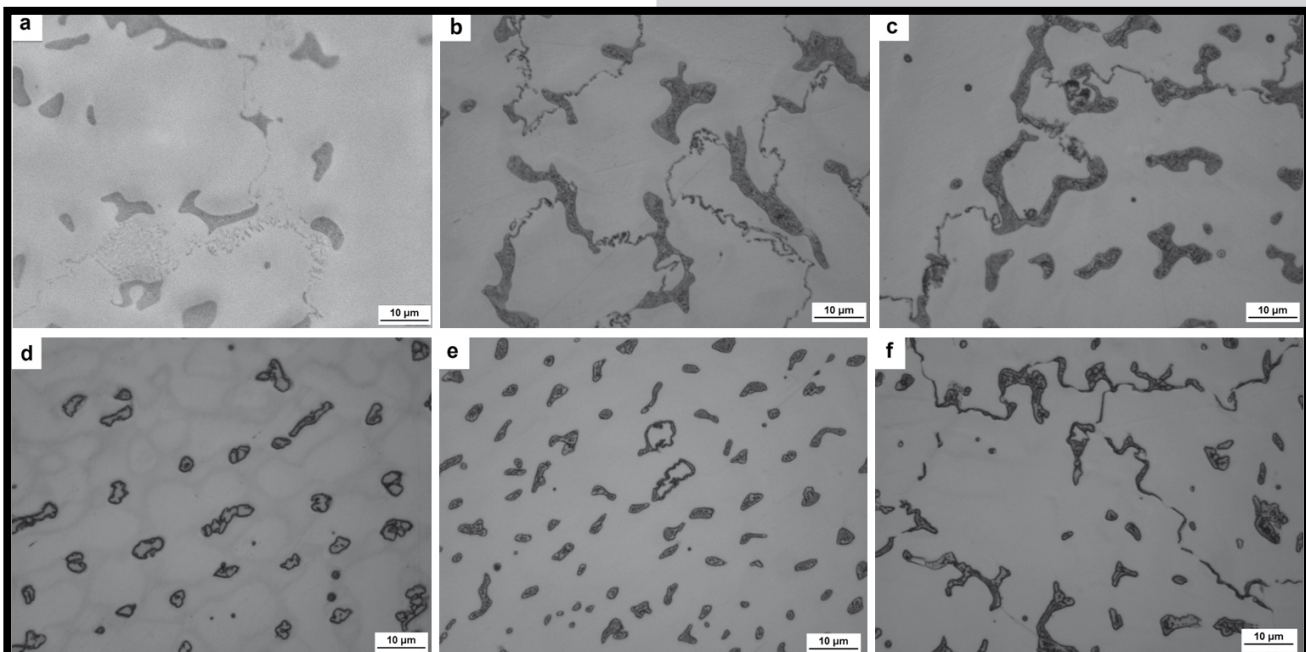
Badania mikrostruktury próbek ze stopu Wironit extra-hard wskazują na ich strukturę dendrytyczną (RYS. 3a,b,c); gruboziarnistą - prezentowaną szerzej w pracy [19]. Wydzielenia ciągle w przestrzeniach międzydendrytycznych są efektem krystalizacji pierwotnej [20]. Odlewy z udziałem złomu charakteryzują się podobną mikrostrukturą (RYS. 3b,c). Nie zaobserwowano wtrąceń, które mogłyby pochodzić z zanieczyszczenia wsadu cząstkami materiału ceramicznego formy. Analiza mikrostruktury na mikroskopie skaningowym (RYS. 4a) pokazuje, że wydzielenia w stopie Wironit extra hard mają charakter blokowy o rozłożeniu pasmowym – co szerzej zostało opisane w pracy Mineta i wsp. [21]. Autorzy tej pracy wykazali, że są to obszary dwufazowe węgliku $M_{23}C_6$ i roztworu α . W obszarach, w których występują wydzielenia blokowe dominuje chrom, co wskazuje na znaczny udział tego składnika w węgliku $M_{23}C_6$ [22-24]. Węglik te mają zróżnicowany, nieregularny kształt i występują na granicach ziaren oraz w obszarach międzydendrytycznych.

Według badań autorów [21,25] drobne wydzielenia węgliku $M_{23}C_6$ mogą przyjmować kształt płytek a ich morfologia powiązania jest z szybkością chłodzenia stopu. Płytkowa budowa ramion, udział ilościowy, morfologia oraz sposób rozmieszczenia wydzieleni w stopach o różnej ilości złomu mogą mieć wpływ na obserwowaną zmianę właściwości wytrzymałościowych. Potwierdzenie tego wniosku wymaga przeprowadzenia szczegółowych badań ilościowych opartych na analizie obrazu.

Mikrostruktura odlewanych próbek ze stopu Heraenium NA (RYS. 3d,e,f) jest bardziej jednorodna i drobnoziarnista w porównaniu do stopu Wironit. Zaobserwowano nieliczne, ciągle wydzielenia międzydendrytyczne na tle fazy γ (roztworu stałego o sieci A1) [26], rozmieszczone wzdłuż granic krystalitów. Wydzielenia te - podobnie jak w stopie na osnowie kobaltu - mają charakter blokowy o budowie eutektycznej (RYS. 4b). Obrazy mikrostruktury próbek ze złomem poprodukcyjnym charakteryzują się zbliżoną mikrostrukturą.

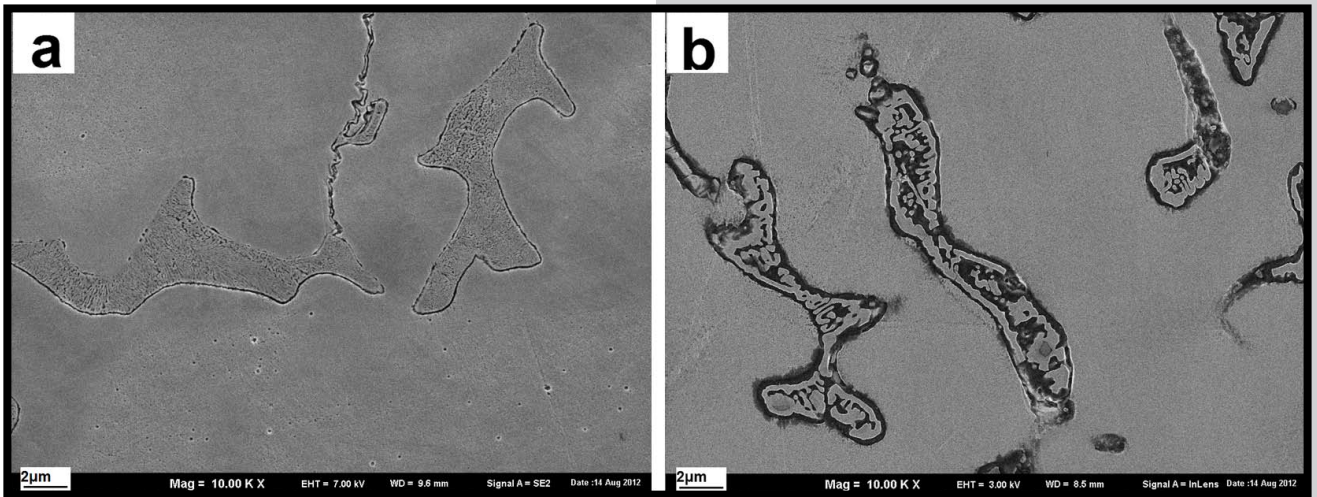
Microstructure evaluations of samples of Wironit extra-hard alloy show their dendritic structure (FIG. 3a,b,c); coarse - presented in more detail in the work [19]. Continuous separations in interdendritic spaces are the result of primary crystallization [20]. Castings with scrap are similar in microstructure (FIG. 3b,c). Inclusions which could be derived from the contamination load of the particles of the ceramic form were not observed. Microstructural analysis obtained from scanning electron microscopy (FIG. 4) shows that the precipitations of the alloy of Wironit extra hard have blocky type character - described among others by Mineta et al. [21]. The morphology of the blocky type precipitates shows the striped nature. The authors of this study have shown that these are the areas of two-phase: $M_{23}C_6$ carbide and the α solution. In the blocky type precipitates areas the presence of chromium is dominant, which indicates significant contribution of chromium in $M_{23}C_6$ carbide [22-24]. These carbides are different, irregular in shape and occur at grain boundaries and in interdendritic areas. According to the studies [21,25], fine $M_{23}C_6$ carbide separation may take the form of a lamella and their morphology could be related with cooling rate of the alloy. Lamellar structure, quantity, morphology and arrangement of the precipitates in alloys with different amounts of scrap metal can affect observed change of the mechanical properties. Confirmation of this conclusion requires a detailed quantitative study based on image analysis.

Microstructure of cast alloy samples of Heraenium NA (FIG. 3d,e,f) has a relatively high homogeneity and finer grain structure than the Wironit extra hard alloy. A few interdendritic, continuous natured precipitations distributed along the borders of crystallites, with γ phase background (solid solution for crystal lattice A1) were observed [26]. Precipitation of these – similarly like in the cobalt matrix alloy have eutectic blocky type nature (FIG. 4b). Images of the samples with the post-production scrap addition have a similar microstructure.



RYS. 3. Struktura stopów: a) Wironit extra-hard o zawartości 100% materiału nowego, b) Wironit extra-hard o zawartości 50% materiału nowego, c) Wironit extra-hard o zawartości 25% materiału nowego, d) Heraenium NA o zawartości 100% materiału nowego, e) Heraenium NA o zawartości 50% materiału nowego, f) Heraenium NA o zawartości 25% materiału nowego.

FIG. 3. Microstructure of alloys: a) Wironit extra-hard containing 100% of new material, b) Wironit extra-hard with 50% new material, c) Wironit extra-hard containing 25% of new material, d) Heraenium NA containing 100% of new material, e) Heraenium NA with 50% new material, f) Heraenium NA containing 25% of new material.



RYS. 4. Eutektyczne wydzielenia typu blokowego w stopach: a) Wironit extra-hard; b) Heraenium NA; SEM.
FIG. 4. Eutectic blocky-type precipitations in alloys: a) Wironit extra-hard b) Heraenium NA; SEM.

Podsumowanie

Na podstawie badań właściwości mechanicznych stwierdzono, że twardość wszystkich przetapianych stopów – zarówno na osnowie kobaltu jak i niklu jest wyższa niż deklarował producent. Dodatek złomu poprodukcyjnego w odlewach powoduje znaczący wzrost wartości twardości. Na podstawie próby zginania uzyskano odmienne wyniki dla obu badanych stopów. Stop na osnowie kobaltu wykazuje obniżenie wytrzymałości na zginanie wraz ze zwiększonym udziałem procentowym złomu poprodukcyjnego. Dla stopu na osnowie niklu wraz ze zwiększającym się dodatkiem złomu poprodukcyjnego wytrzymałość na zginanie wzrasta. W obu typach stopów obecne są blokowe wydzielenia o budowie eutektycznej, w stopie kobaltu obecne są również drobniejsze wydzielenia na granicach ziaren.

Konieczne są dalsze badania celem określenia, czy przyczyną zmiany właściwości mechanicznych i mikrostruktury stopów z dodatkiem złomu poprodukcyjnego jest zmiana parametrów stopu zawierającego materiał z przetopu wtórnego, czy jedynie niewłaściwa technologia przygotowania formy odlewniczej. Planowane są kolejne badania stopów pod kątem odporności korozyjnej oraz wyznaczenie składu chemicznego stopów zawierających złom poprodukcyjny. Pozwoli to odpowiedzieć na pytanie czy i jeśli tak, to w jakiej ilości materiały z recyklingu można stosować w protetyce stomatologicznej bez szkody dla pacjentów.

Podziękowania

Badania naukowe realizowane w powyższej pracy zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki ramach projektu badawczego „Preludium” nr 2011/01/N/ST8/07774.

Autorzy artykułu są wdzięczni dr n. med. Januszowi Borowiczowi z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie za pomoc w realizacji badań.

Summary

On the basis of mechanical properties research, it was found that the hardness of all alloys - both as a matrix of cobalt and nickel is higher than that one declared by the manufacturer. The addition of post-production scrap causes a significant increase in the hardness. Based on the bending test, different results were obtained for both tested alloys. The cobalt matrix alloy shows a decrease in bending strength with an increased percentage amount of post-production scrap. For the nickel matrix alloy with increasing addition of post-production scrap bending strength increase was observed. Samples showed an increase in porosity in the case of both alloys along with increased amount of post-production scrap added to the new material. In both types of alloys the blocky type precipitates with eutectic structure nature are presented; in the alloy of cobalt, at the borders of grains, finer precipitations have also occurred.

Further studies are required to define whether cause of changes in mechanical properties and microstructure of alloys with post-production scrap addition is the modification of parameters of alloy containing remelted material or just failure technology of casting mold preparation. Electrochemical corrosion resistance study as well as determination the chemical composition of the alloys containing post-production scrap are planned to answer the question whether and how much of post-production scrap can be used in dental prosthetic without patients harm.

Acknowledgments

This article was created as a part of a research project of the National Science Centre – “Preludium” No. 2011/01/NST8/07774. The authors are grateful to Dr. Janusz Borowicz, MD, of the Medical University of Lublin for assistance in implementing the study.

Piśmiennictwo

- [1] Surowska B.: Metallic biomaterials and metal-ceramic bond in dental applications. Lublin University of Technology (2009) 9-13 (in Polish).
- [2] Strietzel R.: Recasting of dental alloys. *Dental-labor 4* (2000) 3-6 (in Polish).
- [3] Peraire M., Martinez-Gomis J., Anglada J.M., Bizar J., Salsench J., Gil F.J.: Effects of Recasting on the Chemical Composition, Microstructure, Microhardness, and Ion Release of 3 Dental Casting Alloys and Titanium. *The International Journal of Prosthodontics* 20 (2007) 286-288.
- [4] Majewski S., Opoka W., Gacek S.: Properties of training alloy depending on initial components and multiple castig. *Protetyka Stomatologiczna, XLI*, 4 (1991) 192-198 (in Polish).
- [5] Ozyegin L.S., Tuncer R., Avci E.: Hardness, Behavior and Metal Surface Evaluation of Recasting Non-Precious Dental Alloys. *Key Engineering Materials* 330-332 (2007) 1425-1428.
- [6] Horasawa N., Marek M.: The effect of recasting on corrosion of a silver-palladium alloy. *Dental Materials* 20 (2004) 352-357.
- [7] Hajduga M., Puchalik A.: The assess of usefulness Heraenium NA alloy after remelting in aspect of structural research. *Nowoczesny Technik Dentystyczny 3* (2009) 56-60 (in Polish).
- [8] Bauer J., Cella S., Pinto M.M., Costa J.F., Reis A., Loguercio A.D.: The use of recycled metal in dentistry: Evaluation of mechanical properties of titanium waste recasting. *Resources, Conservation and Recycling* 54 (2010) 1312-1316.
- [9] Al-Ali A.A.: Evaluation of Macrohardness of Recasted Cobalt-Chromium Alloy. *Al-Rafidain Dent J.* 7(1) (2007) 111-117.
- [10] Henriques Guilherme E.P., Consani S., de Almeida Rollo João M.D., Andrade e Silva F.: Soldering and remelting influence on fatigue strength of cobalt-chromium alloys. *Journal of Prosthetic Dentistry* 78 (1997) 146-152.
- [11] Khamis E., Seddik M.: Corrosion evaluation of recasting non-precious dental alloys. *International Dental Journal* 45 (1995) 209-217.
- [12] Ozdemir S., Arikan A.: Effects of recasting on the amount of corrosion products released from two Ni-Cr base metal alloys. *Eur. J. Prosthodont. Rest. Dent.* 6 (1998) 149-153.
- [13] Ameer M.A., Khamis E., Al-Motlaq M.: Electrochemical behaviour of recasting Ni-Cr and Co-Cr non-precious dental alloys. *Corrosion Science* 46 (2004) 2825-2836.

References

- [14] Pierzynka R., Marciniak S., Klimek L.: The influence of remelting number on mechanical properties of DUCINOX alloy. *Nowoczesny Technik Dentystyczny 2* (2010) 22-24 (in Polish).
- [15] Ucar Y., Aksahin Z., Kurtoglu C.: Metal Ceramic Bond After Multiple Casting of Base Metal Alloy. *Journal of Prosthetic Dentistry* 102 (2009) 165-171.
- [16] Joias R.M., Tango R.N., Junho de Araujo J.E., Ferreira Anzaloni Saavedra Gde S., Paes-Junior T.J., et al.: Shear bond strength of ceramic to Co-Cr alloys. *J. Prosthet. Dent.* 99 (2008) 54-59.
- [17] www.bego.com/ - Website of Bego Company; 15 July 2012
- [18] http://www.1dent.pl/_upload/produkt_file/147.pdf - Fact Sheet about Heraenium Na alloy, 15 July 2012
- [19] Beer K., Walczak M.: Structure and mechanical properties of modified CoCrMo alloys for use in dental prosthetics. *Engineering of Biomaterials* 106-108 (2011) 110-115.
- [20] Bojar Z.: Analiza morfologii i składu chemicznego węglików w odlewniczych stopach kobaltu, „Krzepnięcie Metali i Stopów”, PAN – Katowice, Nr 27 (1996) 87-92 (in Polish).
- [21] Mineta S., Namba S., Yoneda T., Ueda K, Narushima T.: Carbide formation and dissolution in biomedical Co-Cr-Mo alloys with different carbon contents during solution treatment. *Metallurgical and Materials Transactions A*, Vol. 41A (2010) 2010-2129.
- [22] Giacchi J.V., Morando C.N., Fornaro O., Palacio H.A.: Microstructural characterization of as-cast biocompatible Co-Cr-Mo alloys. *Materials Characterisation* 62 (2011) 53-61.
- [23] Walczak M., Beer K., Surowska B., Borowicz J.: The issue of using remelted CoCrMo alloys in dental prosthetics. *Archives of Civil and Mechanical Engineering* 12 (2012) 171-177.
- [24] Opiekun Z.A.: Forming the structure and mechanical properties of high-temperature creep resisting, casting cobalt alloys. *Rzeszow University of Technology* (2005) 36-45 (in Polish).
- [25] Walczak M., Beer K., Surowska B., Borowicz J.: The issue of using remelted CoCrMo alloys in dental prosthetics. *Archives of Civil and Mechanical Engineering* 12 (2012) 171-177.
- [26] D.S. Bloom, N.J. Grant: *J. Met., Trans. AIME* (1954) 261-268.

WIELOFUNKCYJNE BIOPOLIMEROWE SKAFOLDY JAKO IMPLANTY KOŚCI

MARIA MUCHA*, MICHAŁ TYLMAN

POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ I OCHRONY ŚRODOWISKA,
KATEDRA TERMODYNAMIKI PROCESOWEJ
UL. WÓLCZAŃSKA 213, 90-924 ŁÓDŹ
* E-MAIL: MUCHAMA@WIPOS.P.LODZ.PL

Streszczenie

W prezentowanej pracy przedstawiono metodykę otrzymywania wielofunkcyjnych skafoldów biopolimerowych (chitozan, polilaktyd) do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej. Skafoldy biopolimerowe z udziałem hydroksyapatytu wytworzono trzema metodami: elektrolityczną, liofilizacyjną oraz wypukowania soli. Zbadano ich właściwości morfologiczne, przeprowadzono badania mikroskopowe powierzchni pod mikroskopem optycznym oraz elektronowym. Zbadano kinetykę kontrolowanego uwalniania kolagenu, który w skafoldach pełni funkcję odżywczą komórek, a także poprawia ich adhezję na powierzchni skafoldu. Kinetyka kontrolowanego uwalniania została opisana funkcją I rzędu oraz dwuetapowym modelem Corrigan-Gallaghery. Przedstawiono możliwości modyfikacji powierzchniowej skafoldów otrzymanych metodą elektrolityczną za pomocą nanosrebra.

Słowa kluczowe: skafoldy polimerowe, inżynieria tkankowa, chitozan, polilaktyd

[Inżynieria Biomateriałów 118 (2013) 12-17]

Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa jest interdyscyplinarną dziedziną medycyny rekonstrukcyjnej, wykorzystującą osiągnięcia takich dziedzin nauki jak: biotechnologia, biologia molekularna komórki, fizyko-chemia polimerów, chirurgia i fizjologia. Inżynieria tkankowa stała się odpowiedzią na problem społeczny, którym było narastające zapotrzebowanie na organy do przeszczepu. Odpowiedzią na to zagadnienie stały się badania nad przeszczepami autogennymi z wykorzystaniem skafoldów polimerowych. Pierwszym etapem tego typu procesu jest pobranie, zróżnicowanie i namnożenie (polifercja) komórek tkanki regenerowanego narządu, a następnie umieszczenie ich na polimerowym skafoldzie w specjalnym reaktorze. Tak przygotowany skafold umieszcza się w miejscu uszkodzenia, w którym spełnia on swoje funkcje do czasu całkowitego jego usunięcia z organizmu.

Skafoldy polimerowe muszą posiadać odpowiednie właściwości morfologiczne, biologiczne oraz mechaniczne. Głównym czynnikiem decydującym o przydatności skafoldu do zastosowań medycznych jest jego biokompatybilność. Równie ważnym czynnikiem jest ogólna porowatość oraz wielkość porów skafoldu. Zasadniczo przyjmuje się, że wielkość oraz układ porów powinien zapewniać niezaburzoną migrację komórek tkanki oraz transport substancji w obrębie implantu [1]. Liczne badania przeprowadzone nad układami porowatymi poddanyymi pod zasiedlenie komórkowe wykazały, że optymalna wielkość porów w przypadku implantacji tkanki kostnej mieści się w zakresie 200-900 μm [2].

MULTIFUNCTIONAL BIOPOLYMERIC SCAFFOLDS FOR BONE IMPLANTS

MARIA MUCHA*, MICHAŁ TYLMAN

LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF PROCESS AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING
DEPARTMENT OF PROCESS THERMODYNAMICS
UL. WÓLCZAŃSKA 213, 90-924 ŁÓDŹ, POLAND
* E-MAIL: MUCHAMA@WIPOS.P.LODZ.PL

Abstract

The paper presents a methodology of multifunctional biopolymeric (chitosan, polylactic acid) scaffolds preparation for use in bone tissue engineering. Biopolymeric scaffolds with hydroxyapatite were prepared by three methods: electrolytic, freeze-drying, and salt leaching. Their morphological properties, using optical and electron microscope were studied. Controlled release kinetics of collagen was also investigated. Collagen has nutritional function for cells and improves their adhesion on the scaffold surface.

Kinetics of controlled release was described by first order function and two-stage Corrigan-Gallagher model. The possibilities of surface modification of scaffolds produced by electrolytic method with nanosilver were presented.

Keywords: polymer scaffolds, tissue engineering, chitosan, polylactide

[Engineering of Biomaterials 118 (2013) 12-17]

Introduction

Tissue engineering is an interdisciplinary area of reconstructive medicine, based on the achievements of such scientific fields as: biotechnology, molecular biology, physico-chemistry of polymers, surgery and physiology. Tissue engineering has become a response to a social problem, which was the increasing demand for organs to transplantation. The answer to this issue became a study of autogenic transplantation with polymer scaffolds. The first step in this type of process is collection of the cells followed by their proliferation and differentiation on polymer scaffolds in a special reactor. Then prepared scaffold is placed in the injury site and fulfils its function, and finally is completely metabolized and removed from the body.

Polymer scaffolds must have appropriate morphological, biological and mechanical properties. The main factor determining scaffolds suitability for medical applications is its biocompatibility. Also important is general porosity and pore size of scaffold. Generally, it is assumed that the size and arrangement of pores should provide unaffected tissue cell migration and transport of substances within the implant [1]. Numerous studies on porous systems showed that the optimum pore size in the case of bone tissue implantation is in the range 200-900 μm [2].

Biopolymer scaffolds should also have good adhesion properties to the cells of regenerating tissue cells [3], and appropriate mechanical properties [4]. In the case of biopolymer scaffolds also rate of degradation is very important. The rate of scaffold biodegradation must be adequate for the rate at which the tissue is regenerated; otherwise in consequence new tissue may be subjected of incidental damage.

Skafoły biopolimerowe powinny wykazywać się też dobrymi właściwościami adhezyjnymi dla komórek regenerowanej tkanki [3], oraz odpowiednimi właściwościami mechanicznymi [4]. W przypadku skafołów biopolimerowych duże znaczenie odgrywa również tempo ich degradacji. Szybkość, z jaką biodegraduje skafoł musi być odpowiednia do szybkości, z jaką regeneruje się tkanka. W przeciwnym wypadku regenerowana struktura może ulegać osłabieniu, a w konsekwencji wtórnym uszkodzeniom.

Najwięcej badań w kierunku otrzymywania skafołów polimerowych zostało przeprowadzonych z udziałem poliestrów, takich jak polilaktyd (PLA), kopolimer laktidu z glikolidem (PLGA) [5], a także polikaprolakton (PCL) [6] ze względu na bardzo dobre właściwości mechaniczne. Ze względu na swoją bioaktywność oraz biokompatybilność dużym zainteresowaniem cieszy się również chitozan należący do grupy wielocukrów [7-8].

Biopolimerowe skafoły uzyskuje się kilkoma metodami, z których do najpopularniejszych należą metody: liofilizacyjna, wypłukiwania cząstek soli oraz elektrospinningu. Metoda liofilizacyjna polega na sublimacyjnym odparowaniu rozpuszczalnika z uprzednio zamrożonego roztworu polimeru. Przestrzenie w strukturze polimeru, z których odparowano rozpuszczalnik tworzą pory [9]. Metoda wypłukiwania soli stosowana jest w przypadku polimerów hydrofobowych, nierozpuszczalnych w wodzie, takich jak PLA. W strukturze polimeru umieszcza się kryształki soli (dodanie do roztworu lub stopu), a następnie wypłukuje się je w strumieniu wody. Metoda ta pozwala na uzyskanie kontrolowanej wielkości porów [10]. Struktury o właściwościach tkaniny uzyskuje się za pomocą elektrospinningu. Metoda ta polega na nakładaniu na siebie kolejnych warstw nici chitozanowych, które rozpyła się za pomocą dyszy w polu elektrycznym o dużym natężeniu [11].

W prezentowanej pracy przedstawiono metodykę otrzymywania oraz podstawowe właściwości morfologiczne skafołów wytworzonych z chitozanu oraz PLA. Zastosowano metody: liofilizacyjną oraz elektrolityczną będącą nowatorską metodą produkcji skafołów za pomocą elektrolizy octanu chitozanu [12]. W przypadku PLA zastosowano metodę wypłukiwania soli. Wytworzone skafoły zostały wzbogacone w dodatek hydroksyapatytu, który poprawia właściwości osteokonduktywne implantów. Przeprowadzono również analizę kinetyki kontrolowanego uwalniania kolagenu stanowiącego substrat pokarmowy komórek oraz polepszającego właściwości adhezyjne powierzchni skafołów dla komórek.

Materiały i metody

Materiały

W doświadczeniu do otrzymania skafołów użyto chitozan (CH), wyprodukowany przez BioLog GmbH o stopniu deacetylacji 85% oraz lepkości 120 mPas oraz polilaktyd (PLA) o temperaturze zeszklenia $T_g=57^\circ\text{C}$, wyprodukowany przez firmę NatureWorks (USA); nano- i mikrododatki stanowiły: hydroksyapatyt (HAp) (mikro) $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ firmy Sigma-Aldrich (funkcja: osteokonduktywna), kolagen (Col) typ II wyprodukowany przez firmę Proteina (funkcja: zwiększenie adhezji komórek na skafołdzie). Użyto również środek sieciujący chitozan - trifosforan sodu TTP ($\text{Na}_5\text{O}_{10}\text{P}_3$) z firmy Fluka.

Metoda liofilizacyjna

Przygotowano 2% roztwór chitozanu w 1% kwasie octowym. Do roztworu dodano hydroksyapatyt w ilości 20% w stosunku do masy chitozanu. Układ poddano mieszaniu magnetycznemu, a następnie ultradźwiękowemu przez czas 1,5 h w celu uzyskania dobrej dyspersji HAp w roztworze. Po tym procesie do układu dodano 4% wodny roztwór kolagenu i poddano mieszaniu magnetycznemu.

Most studies is directed to obtaining polymer scaffold from polyesters such as polylactide (PLA), the copolymer of lactide and glycolide (PLGA) [5] and polycaprolactone (PCL) [6] because of their very good mechanical properties. Due to its high bioactivity and biocompatibility a great interest has chitosan - a polymer belonging to a group of polysaccharides [7-8].

Biopolymer scaffolds are obtained by several methods, which the most popular are: freeze drying, salt leaching and electrospinning. The freeze drying method involves solvent evaporation from previously frozen polymer solution. The spaces in the structure of the polymer, from which the solvent was evaporated, form pores [9]. Salt leaching method is used in the case of hydrophobic polymers, insoluble in water, such as PLA. In polymer structure crystals of salt are placed (added to the solution or melt), then they are leached away in the stream of water. This method allows to obtain the scaffolds with controlled pore size [10]. Structures with textile properties are obtained by electrospinning method. This method involves on successive imposition layers of chitosan strands, which are sprayed from a nozzle, in an electric field of high intensity [11].

In this paper the methods of preparation and basic morphological properties of chitosan and PLA scaffolds are presented. Scaffolds were obtained by: freeze drying and the electrolytic methods [12-13]. In the case of PLA salt leaching method was used. Obtained scaffolds were enriched in hydroxyapatite additive that improves the osteoconductive properties of the implants. An analysis of release kinetics of collagen is shown. Collagen is nutrient substrate for cells and enhances adhesion of cells to the scaffolds surface.

Materials and Methods

Materials

In the studies chitosan (CH) which deacetylation degree of 85% and a viscosity of 120 mPas produced by BioLog GmbH and polylactide (PLA) with glass transition temperature $T_g=57^\circ\text{C}$ manufactured by NatureWorks (USA) were used. Nano- and microadditives were: hydroxyapatite (HAp) (micro-size), $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ from Sigma-Aldrich (osteoconductive function), collagen (Col) type II manufactured by Proteina (function: increasing the adhesion of cells on scaffold surface), chitosan cross-linking agent - sodium triphosphate (TTP) ($\text{Na}_5\text{O}_{10}\text{P}_3$) from Fluka.

Freeze drying method

2% solution of chitosan in 1% acetic acid was prepared. Hydroxyapatite in 20% by weight to chitosan was added. The system was subjected to magnetic and ultrasound stirring by the time of 1.5 h, in order to obtain good dispersion of HAp in the solution. After this process, 4% aqueous solution of collagen was added in proper amount and stirring. The solution was placed in a thermally stabilized vessel (temperature 4°C). With intensive stirring, the solution was crosslinked by 0.1 molar aqueous solution of TTP. The weight ratio of chitosan to crosslinking agent was 10:1. Next the solution was moved to a Petri dish, placed on a hot stage at a temperature of 55°C and the solvent 40% by volume was evaporated. The concentrated solution was frozen at -37°C and then subjected to freeze-drying in a deep vacuum.

Electrolytic method

The resulting solution of chitosan with hydroxyapatite and collagen (obtained as before) was transferred to an electrolytic 100 ml cell and subjected to electrolysis.

Roztwór umieszczono w termicznie stabilizowanym naczyniu (temp. 4°C). Intensywnie mieszając, roztwór poddano sieciowaniu 0,1-molowym wodnym roztworem TTP. Stosunek wagowy polimeru do środka sieciującego wynosił 10:1. Następnie roztwór przeniesiono na szalkę Petriego, umieszczoną na płycie grzejnej o temperaturze 55°C i odparowano 40% objętości rozpuszczalnika. Zagęszczony roztwór zamrożono w temperaturze -37°C, a następnie poddano suszeniu liofilizacyjnemu w warunkach głębokiej próżni.

Metoda elektrolityczna

Otrzymany roztwór chitozanu z hydroksyapatytem i kolagenem (przygotowany jak dla metody liofilizacyjnej) przeniesiono do naczynka elektrolitycznego o pojemności 100 ml i poddano elektrolizie. W doświadczeniu użyto elektrod ze stali nierdzewnej, układ zasilany był za pomocą stabilizowanego zasilacza laboratoryjnego MNS-300. Napięcie między elektrodami wynosiło 20 V. Proces elektrolizy prowadzono przez czas 10 minut. Uzyskany na katodzie hydrożel przeniesiono na szalkę Petriego i poddano suszeniu liofilizacyjnemu. Scaffolds uzyskane metodą elektrolityczną zostały również pokryte warstwą nanosrebra w celu polepszenia ich antybakteryjnych właściwości. Wodna dyspersja nanosrebra uzyskanego w procesie redukcji azotanu srebra przez kwas askorbinowy została dodana do elektrolitu w końcowym okresie procesu, co pozwoliło na uzyskanie równomiernej warstwy nanosrebra na powierzchni scaffoldu.

Metoda wypłukiwania cząstek soli

Przygotowano 4% roztwór PLA w dichlorometanie, a następnie dodano do niego 20% wagowych HAp. Roztwór poddano naprzemiennemu mieszanemu ultradźwiękowemu i magnetycznemu, przez czas 2 h. Następnie w suszarce próżniowej z roztworu odparowano rozpuszczalnik (T=55°C). 4 g uzyskanego kompozytu PLA/HAp umieszczono w reaktorze. Reaktor stanowiło naczynie wykonane ze stali nierdzewnej, wyposażone w zdejmowane dno oraz ruchomy tłok zamykający je od góry. Reaktor umieszczono w stabilizowanej termicznie prasie hydraulicznej, ogrzano do temperatury 130°C pod ciśnieniem 6 MPa, przez czas 20 minut, a następnie ochłodzono. Na powierzchni kompozytu CH/HAp umieszczono uprzednio wysuszoną sól NaCl (wielkość kryształów ~0,3 mm). Reaktor zamknięto i ponownie poddano działaniu temperatury 130°C i ciśnienia 6 MPa, co spowodowało wprasowanie kryształów soli w zmiękczony polimer. Po ochłodzeniu z reaktora wyjęto powstały układ i umieszczono w przepływającym strumieniu wody o temperaturze 50°C, w celu wypłukania kryształów soli z matrycy polimeru. Ze względu na hydrofobowość polilaktidu oraz wysokie temperatury procesu scaffoldy zostały wytworzone bez dodatku kolagenu.

Morfologia scaffoldów

Wykonano zdjęcia mikroskopowe scaffoldów, w celu określenia ich budowy morfologicznej. Mikrofotografie zostały wykonane za pomocą mikroskopu stereoskopowego Bresser Advanced ICD w świetle odbitym oraz mikroskopu elektronowego SEM (JSM-5500LV Joel). Średnia wielkość porów została określona za pomocą programu MicroView, natomiast porowatość całkowitą (P) scaffoldów określono korzystając ze wzoru: $P=(V_s-V_p)\cdot V_p$, gdzie: V_s - objętość scaffoldu [cm^3], V_p - objętość polimeru w scaffoldzie.

Kinetyka uwalniania kolagenu

Zbadano szybkość uwalniania kolagenu do buforu z otrzymanych scaffoldów chitozanowych. Badanie kinetyki uwalniania przeprowadzono analizując zachodzące w czasie zmiany absorbancji światła w widmie UV-Vis dla piku charakterystycznego kolagenu ($\lambda=255$ nm), za pomocą spektrofotometru Jasco V630.

In the experiment stainless steel electrodes were used and the system (with a stabilized laboratory power supply MNS-300) was powered. Voltage between the electrodes was 20 V. The electrolysis was carried out for 10 minutes. Obtained (on the cathode) hydrogel was moved to a Petri dish and subjected to freeze drying. Scaffolds obtained by the electrolytic method were coated with nanosilver layer in order to improve their antimicrobial properties. Nanosilver aqueous dispersion was obtained by ascorbic acid reduction of silver nitrate. Nanosilver was added to electrolyte in the final stages of the electrolysis process. After one minute electrolysis was stopped. Surface of hydrogel structure of scaffold by thin nanosilver layer was coated. The hydrogel was pre-frozen for 24 hours at -37°C and subjected to lyophilization in a deep vacuum.

Salt leaching

4% solution of PLA in dichloromethane was prepared, and then 20 wt% HAp was added. The solution was subjected to ultrasound and magnetic stirring, for 2 hours. Then, in a vacuum dryer (T=55°C) solvent from the solution was evaporated. 4 g of the PLA/HAp composite in the reactor was placed. The reactor vessel was made of stainless steel, equipped with a removable bottom and a movable plunger, locking it from the top. The reactor was placed in a thermally stabilized hydraulic press and heated to 130°C under pressure 6 MPa, for 20 minutes and then cooled. On the surface of the CH/HAp composite a previously dried salt NaCl (crystal size ~0.3 mm) was placed. The reactor was closed and again subjected to a temperature of 130°C and pressure 6 MPa, causing salt crystals pressing into the polymer matrix. After cooling the resulting composite was removed from reactor and in a stream of water at 50°C was placed, in order to leaching salt crystals from the polymer matrix. Due to the hydrophobicity of polylactide and high temperature process scaffolds have been produced without the addition of collagen.

Scaffolds morphology

In order to determine morphological structure of obtained scaffolds photomicrographs with stereomicroscope Bresser Advanced ICD in reflected light and electron microscope SEM (scanning electron microscope JSM-5500LV Joel) have been done. Average pore size was determined using MicroView programme, while total porosity (P) of scaffolds was determined according to the formula: $P=(V_s-V_p)\cdot V_p$, where: V_s - volume of scaffolds [cm^3], V_p - polymer volume in scaffolds.

The release kinetics of collagen

Rate of collagen release from chitosan scaffolds into the buffer of pH=7.2 was studied. The study of release kinetics was carried out by analyzing change in time for light absorbance of the characteristic peak of collagen ($\lambda=255$ nm) in UV-Vis spectra using Jasco V630 spectrophotometer.

Results and Discussions

Scaffolds morphology

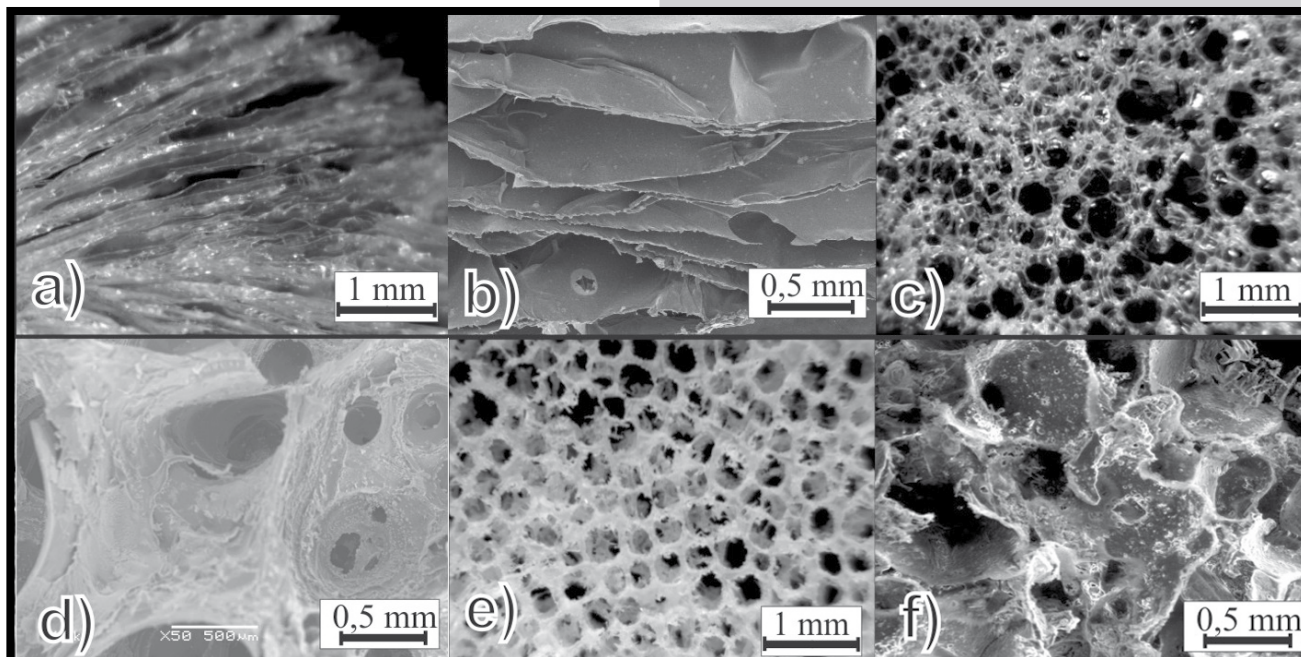
TABLE 1 presents a comparison of scaffold characteristics (porosity, average pore size) with 20% HAp obtained by different methods.

FIGs 1 and 2 present the photomicrographs of scaffolds surface prepared using different methods by optical and scanning electron microscopy (SEM).

Scaffolds obtained by the electrolytic method are characterized by an irregular dispersion of hydroxyapatite in the polymer matrix. HAp crystals have sizes in the range 5-30 μm .

TABELA 1. Charakterystyka szkieletów otrzymanych za pomocą różnych metod.
TABLE 1. Characteristics of scaffolds obtained by different methods.

Metoda Method	Porowatość szkieletu Scaffold porosity [%]	Średnia wiel- kość porów Average pore size [mm]	Charakterystyka porów Characteristics of pores	Ilość kolagenu [%] (w stosunku do masy szkieletu) The amount of collagen [%] (relative to the scaffolds weight)
Liofilizacyjna Freeze drying	92-98	0.4 – 1	Wydłużone Extended	5-10
Elektrolityczna Electrolytic	80-85	0.05 – 0.4	Sferyczne Spherical	7-12
Wypłukiwanie cząsteczek soli Salt leaching	85-91	~0.3	Sferyczne Spherical	3-4



RYS. 1. Mikrofotografie powierzchni szkieletów uzyskanych metodą liofilizacyjną (a,b), elektrolityczną (c,d) oraz wypłukiwania cząsteczek soli (e,f) wykonane za pomocą mikroskopu optycznego (a,c,e) i elektronowego (b,d,f).
FIG. 1. Microphotographs of the surface of scaffolds obtained by freeze drying (a,b), electrolytic (c,d) and salt leaching method (e,f) made by means of optical (a,c,e) and electron microscope (b,d,f).

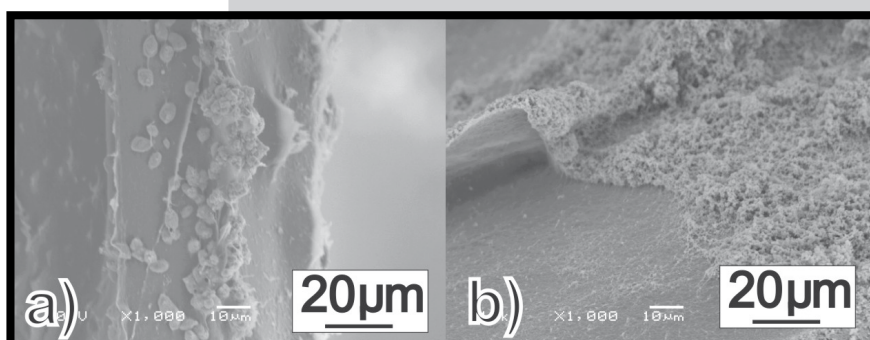
Wyniki i dyskusja

Morfologia szkieletów

W TABELI 1 przedstawiono porównanie charakterystyk szkieletów (porowatość, średnia wielkość porów) otrzymanych różnymi metodami z 20% zawartością HAp.

Na RYS. 1 i 2 przedstawiono odpowiednio mikrofotografie powierzchni szkieletów uzyskanych różnymi metodami przy użyciu mikroskopów optycznego oraz elektronowego SEM.

Szkielety otrzymane metodą elektrolityczną charakteryzują się nieregularną dyspersją hydroksyapatytu w matrycy polimeru. Kryształy HAp posiadały wymiary w przedziale 5-30 μm . Nanosrebro otrzymane metodą redukcji utworzyło aglomeraty o wielkości cząstek 200-300 nm i pokryło powierzchnię szkieletu jednorodną warstwą o grubości 4-12 μm (grubość warstwy oszacowana na podstawie analizy mikrofotografii SEM).



RYS. 2. Mikrofotografie SEM szkieletu uzyskanego metodą elektrolityczną: a) przekrój poprzeczny z widocznymi kryształami HAp, b) warstwa nanosrebra na powierzchni szkieletu.

FIG. 2. SEM microphotographs of scaffold obtained by the electrolytic method: a) cross section with visible HAp crystals, b) nanosilver layer on scaffold surface.

Nanosilver obtained by reduction process formed agglomerates with chitosan of particle size 200-300 nm and the scaffold surface was covered by homogeneous layer with a thickness of 4-12 μm (layer thickness measurement carried out by the SEM microphotographs analysis).

Kinetyka uwalniania kolagenu

Uwalnianie kolagenu przeprowadzono do buforu o pH=7,2. Do uzyskanych krzywych kinetycznych, dopasowano modele kinetyczne: kinetyka I rzędu (1) oraz Gallaghiera-Corrigana (2).

$$f_t = f_{t_{\max}} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) \quad (1)$$

$$f_t = f_B \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) + (f_{t_{\max}} - f_B) \cdot \left(\frac{e^{k_2 \cdot (t - t_{2_{\max}})}}{1 + e^{k_2 \cdot (t - t_{2_{\max}})}} \right) \quad (2)$$

gdzie:

f_t - udział leku uwolnionego w czasie t ($f_t = C_t/C_0$, C_t - stężenie leku uwolnionego w czasie t , C_0 - całkowite stężenie leku znajdujące się w matrycy polimeru poddanej badaniu),

$f_{t_{\max}}$ - maksymalny udział leku uwolnionego podczas procesu, f_B - udział leku uwolnionego podczas pierwszego etapu (burst effect),

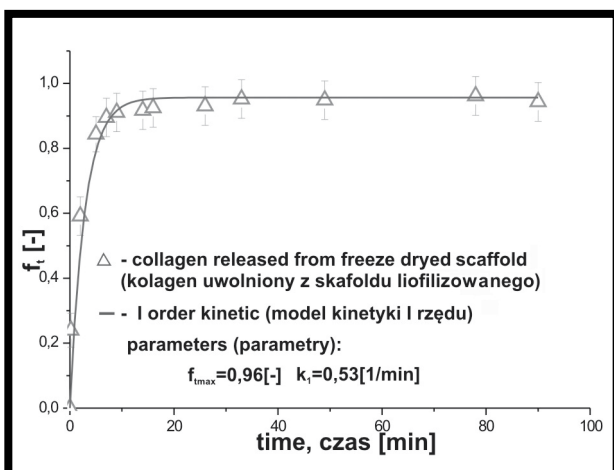
k_1 - stała kinetyczna pierwszego rzędu (pierwszego etapu procesu),

k_2 - stała kinetyczna drugiego etapu procesu (związana z degradacją matrycy polimeru),

$t_{2_{\max}}$ - czas, w którym w drugim etapie procesu uwalnianie zachodzi z największą szybkością.

Na RYS. 3 i 4 przedstawiono krzywe kinetyczne uwalniania kolagenu z skafoldów chitozanowych uzyskanych metodami liofilizacyjną oraz elektrolityczną.

Uwalnianie kolagenu z skafoldów uzyskanych metodą liofilizacyjną ma charakter kinetyki I rzędu z widocznym etapem „burst effect” (czas 0-10 minut). Szybkość procesu uwalniania z skafoldów liofilizowanych (90% kolagenu zawartego w skafoldzie uwolnione zostaje w ciągu pierwszych 20 minut procesu) wskazuje na powierzchniowe usytuowanie kolagenu w matrycy polimeru. W procesie wstępnego wymrażania cząsteczki kolagenu zostają z wodą wypchnięte poza roztwór chitozanu, a po odparowaniu wody kolagen pozostaje na zewnętrznych ścianach porów skafoldów. W przypadku skafoldów wytworzonych metodą elektrolityczną uwiadcza się dwuetapowość procesu uwalniania. W ciągu 5 godzin procesu zostaje uwolniony kolagen umiejscowiony powierzchniowo w skafoldzie (około 0,5% kolagenu w matrycy znajduje się na powierzchni skafoldu). Drugi etap uwalniania związany jest z pewną dekompozycją matrycy polimeru, po 200 godzinach procesu zostaje uwolnione około 35% kolagenu zawartego w skafoldzie.



RYS. 3. Model kinetyczny I rzędu uwalniania kolagenu z chitozanowego skafoldu uzyskanego metodą liofilizacyjną.

FIG. 3. First order kinetic model of collagen release from chitosan scaffold obtained by the freeze drying method.

Collagen kinetic release

For obtained kinetic curves, kinetic models were fitted: first order kinetics (1) and Gallagher-Corrigan (2).

$$f_t = f_{t_{\max}} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) \quad (1)$$

$$f_t = f_B \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) + (f_{t_{\max}} - f_B) \cdot \left(\frac{e^{k_2 \cdot (t - t_{2_{\max}})}}{1 + e^{k_2 \cdot (t - t_{2_{\max}})}} \right) \quad (2)$$

where:

f_t - fraction of drug released at time t ($f_t = C_t/C_0$, C_t - concentration of drug released at time t , C_0 - the total concentration of drug contained in the polymer matrix),

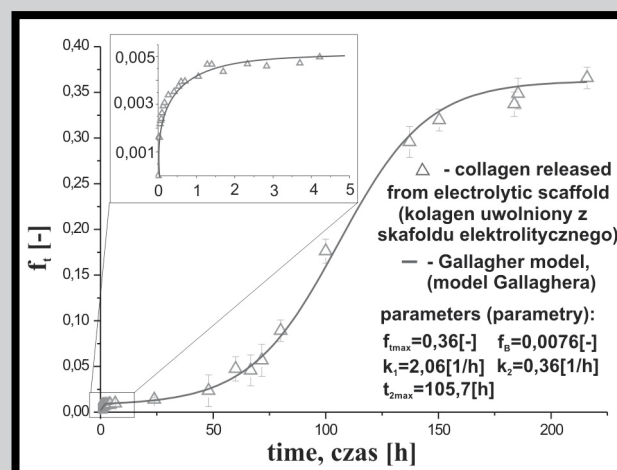
$f_{t_{\max}}$ - the maximum fraction of drug released during the process, f_B - the fraction of drug released during the first stage (burst effect),

k_1 - first-order kinetic constant (the first stage of the process), k_2 - the kinetic constant of the second stage of the process (related to the decomposition or desintegration of the polymer matrix),

$t_{2_{\max}}$ - a time at which in the second stage the release achieves a maximum rate.

FIGs 3 and 4 present the kinetic curves of collagen release from chitosan scaffolds obtained by freeze drying and electrolytic methods.

Release of collagen from scaffolds obtained by freeze drying method is a first order kinetics with a visible “burst effect” stage (time 0-10 minutes). The rate of freeze drying scaffolds release (90% of the collagen contained in scaffold is released during the first 20 minutes of the process) shows the collagen is located on the surface of the polymer matrix. In the initial freezing, collagen molecules are pushed out together with water from aqueous chitosan solution. After water evaporation collagen remains on the outer walls of the scaffold pores. In the case of scaffolds obtained by the electrolytic method the two-stage release process is detected. Within the first five hours of process collagen present close to scaffold pores surface (0.5%) is released. The second stage of release is associated with a decomposition of the polymer matrix. After 200 hours of process about 35% of the collagen is released.



RYS. 4. Krzywa kinetyczna uwalniania kolagenu z chitozanowego skafoldu uzyskanego metodą elektrolityczną.

FIG. 4. Kinetic curve of collagen release from chitosan scaffold obtained by the electrolytic method.

Wnioski

Skafoldy biopolimerowe mogą stać się dobrą alternatywą dla obecnie stosowanych implantów. Właściwości morfologiczne otrzymanych struktur w znacznym stopniu zależą od metody otrzymywania skafoldów. Struktury uzyskiwane prezentowanymi metodami pozwalają na uzyskanie skafoldów o porowatości powyżej 80% oraz dobrych właściwościach mechanicznych (wyniki testów mechanicznych nie prezentowane w publikacji). Właściwości mechaniczne skafoldów otrzymanych z PLA są nieznacznie gorsze niż w przypadku skafoldów uzyskanych z polimerów biostabilnych (takich jak PET). Multifunkcyjne skafoldy biopolimerowe mogą być nośnikami substancji niezbędnych w procesie regeneracji tkanki kostnej w tym hydroksyapatytu i kolagenu.

Skafoldy otrzymane metodą elektrolityczną pozwalają na długoterminowe dostarczanie kolagenu (powyżej 200 godzin), co pozytywnie może wpływać na proces regeneracji. Ponadto można im nadawać dodatkowe właściwości bakteriobójcze poprzez pokrycie warstwą nanosrebra. Skafoldy takie wytworzone są z czystego chitozanu (nierozpuszczalnego w wodzie), przez co nie istnieje konieczność dodatkowego procesu sieciowania.

Podziękowania

Badanie zrealizowane z środków finansowych grantu badawczego (NCN) nr 2011/01/B/ST8/06679, pt. „Badania stabilności środowiskowej nanokompozytów biopolimerowych” oraz grant wewnętrzny dla młodych naukowców Wydziału Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej pt. „Ukierunkowana modyfikacja chitozanowych implantów kości w celu poprawy ich właściwości bioaktywnych”.

Conclusions

Biopolymer scaffolds can become a good alternative to currently used implants. Morphological properties of obtained structures significantly depend on the methods of scaffold preparation. Presented methods allow to obtain scaffolds with porosity above 80%, and good mechanical properties (results of mechanical tests not presented here). Mechanical properties of PLA scaffolds are slightly lower than those obtained from biostable polymers (such as PET). Multifunctional biopolymer scaffolds can be the carriers of necessary for regeneration substances in bone tissue including hydroxyapatite and collagen.

Scaffolds produced by electrolytic method allow for long-term supply of collagen (over 200 hours), which can positively influence the regeneration process. Moreover, they may be capable of possessing additional antibacterial properties by nanosilver coating. These scaffolds are made of pure chitosan (water insoluble), so there is no need for additional cross-linking process.

Acknowledgements

Research carried out by a research grant (NCN) No 2011/01/B/ST8/06679: “Environmental stability studies of biopolymer nanocomposites”, and the Faculty of Process and Environmental Engineering of Technical University of Lodz as an internal grant for young scientists: “Targeted modification of chitosan bone implants to improve its bioactive properties”.

Piśmiennictwo

- [1] Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K.: The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 7 (2001) 679-689.
- [2] Maquet V., Jerome R.: Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. *Mater Sci Forum* 25 (1997) 15-45.
- [3] Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K.: The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng* 8 (2002) 1-11.
- [4] Hutmacher D.W., Schantz T., Zein I., Ng K.W., Teoh S.H., Tan K.C.: Mechanical properties and cell cultural response of a polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res* 55 (2001) 203-216.
- [5] Kim S.J., Jang D.H., Park W.H., Min B-H.: Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds. *Polymer* 51 (2010) 1320-1327.
- [6] Salerno A., Maio D.E., Iannace S.: Tailoring the pore structure of PCL scaffolds for tissue engineering prepared via gas foaming of multi-phase blends. *J Porous Mater* 19 (2012) 181-188.
- [7] Muzzarelli R.A.A.: Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 76 (2009) 167-182.

References

- [8] Mucha M.: Chitozan - wszechstronny polimer ze źródeł odnawialnych (Chitosan - universal polymer from renewable sources) WNT, Warszawa (2010).
- [9] Thein-Han W.W., Misra R.D.K.: Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1182-1197.
- [10] Reignier J., Huneault M.A.: Preparation of interconnected poly(ϵ -caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching. *Polymer* 47 (2006) 4703-4717.
- [11] Zhang D., Chang J., Zeng Y.: Fabrication of fibrous poly(butylene succinate)/wollastonite/apatite composite scaffolds by electrospinning and biomimetic process. *J Mater Sci: Mater Med* 19 (2008) 443-449.
- [12] Mucha M., Tylman M.: Chitosan scaffolds with active nanofillers prepared by electrolytic method. *Advance in Chitin Science* 111 (2011) 192-196.
- [13] Mucha M., Tylman M.: Sposób elektrolityczny wytwarzania porowatych chitozanowych implantów kostnych. Zgłoszenie patentowe nr P-394068 (2011).

STERYLIZACJA RADIACYJNA BIORESORBOWALNYCH KOPOLIMERÓW ZAWIERAJĄCYCH LEK CYTOSTATYCZNY

MONIKA MUSIAŁ-KULIK^{1,2*}, KATARZYNA GĘBAROWSKA¹, HENRYK JANECZEK¹, MAŁGORZATA PASTUSIAK¹, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2}, PIOTR DOBRZYŃSKI¹

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

² KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,

UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC

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

Streszczenie

Istnieje wiele metod sterylizacji wyrobów medycznych. Jednak najbardziej użytecznymi metodami sterylizacji syntetycznych, bioresorbowalnych polimerów wydają się być promieniowanie gamma oraz napromienianie wiązką elektronów (EB). Celem tej pracy było określenie wpływu wspomnianych metod na trzy rodzaje matryc – zawierających 3%, 5% paklitakselu oraz matryc bez leku. Badane matryce otrzymano z dwóch rodzajów poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny) zsyntezowanych w 150°C (P1) oraz 120°C (P2). Nie zaobserwowano znaczących różnic w składzie komonomerów matryc sterylnych i niesterylnych, zawierających paklitaksel, jak i matryc bez leku. Spadek temperatury zeszczenia (T_g) wynikał ze zmniejszenia się średniej długości bloków laktydylowych oraz węglanowych, a także utraty M_n po procesie sterylizacji. Zauważalne były niewielkie różnice we właściwościach fizykochemicznych matryc napromienianych promieniowaniem gamma oraz wiązką elektronów. Otrzymane wyniki pokazują, iż lepszą metodą sterylizacji poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny) wydaje się być napromienianie wiązką elektronów.

Słowa kluczowe: poli(L-laktydo-ko-węglan trimetylen), paklitaksel, promieniowanie gamma, napromienianie wiązką elektronów, sterylizacja

[Inżynieria Biomateriałów 118 (2013) 18-22]

Wprowadzenie

Paklitaksel (PTX), znany od około 40 lat, posiada wiele mechanizmów działania. Zatrzymuje mitozę komórek mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych (SMCs) poprzez łączenie się z β -tubuliną, przez co stabilizuje mikrotubule, ale może też wpływać na komórki układu immunologicznego (komórki 'naturalni zabójcy', komórki dendrytyczne, makrofagi) [1]. Paklitaksel wykazuje antyneoplastyczne oraz antyrestenotyczne właściwości i dlatego hamuje proliferację oraz migrację SMCs [2].

Postęp medycyny i farmacji przyczynia się do poszukiwania nowych zastosowań dla materiałów polimerowych, które składają się głównie z laktydu, glikolidu, węglanu trimetyleny oraz ϵ -kapolaktonu. Są one szeroko stosowane jako nici chirurgiczne, zszywki chirurgiczne, śruby kostne, skafoldy w inżynierii tkankowej czy systemy uwalniania leków [3].

RADIATION STERILIZATION OF BIORESORBABLE COPOLYMERS WITH THE CYTOSTATIC DRUG

MONIKA MUSIAŁ-KULIK^{1,2*}, KATARZYNA GĘBAROWSKA¹, HENRYK JANECZEK¹, MAŁGORZATA PASTUSIAK¹, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2}, PIOTR DOBRZYŃSKI¹

¹ CENTRE OF POLYMER AND CARBON AND MATERIALS, POLISH ACADEMY OF SCIENCES,

34 M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE STR., 41-819 ZABRZE, POLAND

² DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,

1 NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

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

Abstract

There are many methods of sterilization approved for medical devices. However, the most usable methods of synthetic, bioresorbable polymers sterilization seem to be gamma radiation and electron beam irradiation (EB). The aim of this work was to determine the impact of mentioned methods on three types of matrices - containing 3%, 5% of paclitaxel and also drug free matrices. The studied matrices were obtained from two poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates) synthesized at 150°C (P1) and 120°C (P2). No significant differences of comonomers' composition were observed in sterile and non-sterile matrices containing paclitaxel as well as drug free matrices. The decrease of the glass transition temperature (T_g) resulted from decrease of the lactidyl and carbonate units' content and the M_n loss after radiation. Small dissimilarities of physicochemical features between gamma and EB radiated matrices were noticeable. Thus, the obtained data showed that better method of sterilization of poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates) seems to be electron beam radiation.

Keywords: poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate), paclitaxel, gamma irradiation, electron beam radiation, sterilization

[Engineering of Biomaterials 118 (2013) 18-22]

Introduction

Paclitaxel (PTX), well known for almost 40 years, possesses many sites of action. It inhibits mitosis of smooth muscle cells through binding the β -tubulin and though stabilizing microtubules but can also influence the immune cells (natural killer cells, dendritic cells, macrophages) [1]. Paclitaxel has anti-neoplastic as well as anti-restenotic abilities for as much it inhibits smooth muscle cells proliferation and migration [2].

Advance in medicine and pharmacy contributes to search new applications of polymer materials which are mostly composed of lactide, glycolide, trimethylene carbonate and ϵ -caprolactone. They are widely used as sutures, staples, bone screws, scaffolds in tissue engineering or drug delivery systems [3]. Controlled delivery systems of paclitaxel may serve as totally bioresorbable coronary artery stents or anticancer implants.

Systemy kontrolowanego uwalniania paklitakselu mogą służyć jako całkowicie bioresorbowalne stenty tętnic wieńcowych oraz przeciwnowotworowe implanty.

Istnieje wiele metod sterylizacji wyrobów medycznych m.in. cieplne (suche gorące powietrze lub gorąca para wodna np. autoklawowanie), chemiczne (np. tlenek etylenu), ciśnieniowe oraz napromienianie (promieniowanie gamma, promieniowanie X, wiązka elektronów, wiązka jonów) [4]. To zrozumiałe, że wyroby otrzymane z bioresorbowalnych polimerów nie powinny być sterylizowane w wysokiej temperaturze ze względu na pogorszenie się ich właściwości mechanicznych. Tlenek etylenu również nie jest zalecany ze względu na swoje pozostałości. Najbardziej użytecznymi dla syntetycznych polimerów wydają się być metody sterylizacji wykorzystujące promieniowanie gamma oraz wiązkę elektronów (EB).

Materialy i metody

Dwa rodzaje poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny) (PLATMC) zostały zsyntezowane w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu przy użyciu $Zr(Acac)_4$ jako niskotoksycznego inicjatora kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia. Reakcja była przeprowadzona w $150^\circ C$ (P1) oraz w $120^\circ C$ (P2), stosunek inicjatora do monomerów (I/M) wynosił 1/1000. Paklitaxel (PTX) zakupiono w LC Laboratories®.

Odpowiednią ilość kopolimeru i paklitakselu rozpuszczono osobno w chlorku metylenu (DCM). Następnie te dwa roztwory zmieszano, odgazowano pod zmniejszonym ciśnieniem i wylano na teflonowe formy. Filmy wysuszono w temperaturze pokojowej i pod zmniejszonym ciśnieniem. 10 mm krążki zostały wycięte z filmów. Matryce bez leku zostały również przygotowane zgodnie z procedurą opisaną powyżej.

Każdy rodzaj matrycy: 0%, 3% oraz 5% PTX był hermetycznie zamknięty i napromieniany przy użyciu wiązki elektronów oraz promieniowania gamma.

Próbki sterylizowano wiązką wysokoenergetycznych elektronów o energii 10 MeV generowaną przez akcelerator elektronowy. ^{60}Co stanowił źródło promieniowania gamma, moc dawki wynosiła 8,28 kGy/h. Oba źródła promieniowania dostarczyły dawkę 25 kGy.

Sterylnie i niesterylne matryce zbadano z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz chromatografii żelowej (GPC).

Chromatografia żelowa (GPC, Physics SP 8800) posłużyła do zbadania liczbowo średnich mas cząsteczkowych (M_n) oraz rozrzutu mas cząsteczkowych (D). Rozpuszczalnikiem był chloroform.

Termiczne właściwości, takie jak temperatura zeszklenia T_g , temperatura topnienia T_m oraz entalpia topnienia ΔH_m oznaczono za pomocą skaningowego kalorymetru różnicowego (TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE). Matryce skanowano dwukrotnie w zakresie -50 do $200^\circ C$ (szybkość ogrzewania $20^\circ C/min$). Próbki szybko schładzano do $-100^\circ C$ w ciekłym azocie w celu otrzymania amorficznych kopolimerów. DSC kalibrowano standardami galu i indu. T_m oraz ΔH_m wyznaczono z pierwszego skanu, natomiast T_g z drugiego.

Zmiany w składzie komonomerów, średniej długości bloków laktydylowych ($^{(L)}$) i węglanowych ($^{(C)}$) określono na podstawie widm 1H NMR zarejestrowanych przez nadprzewodzący spektrometr magnetycznego rezonansu jądrowego wysokiej rozdzielczości – 600 MHz (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker). $CDCl_3$ był rozpuszczalnikiem, tetrametylosilan (TMS) – standard wewnętrzny.

There are many methods of sterilization approved for medical devices as heat (dry heat or moist heat such as autoclaving), chemicals (e.g. ethylene oxide), pressure or irradiation (gamma rays, X rays, electron beam, ion beams) [4]. It is understood that devices made of bioresorbable polymers should not be sterilized at high temperature because of decrease of their mechanical properties. Ethylene oxide is also not recommended due to its residues [5]. The most usable methods for synthetic polymers sterilization seem to be gamma radiation and electron beam irradiation (EB).

Materials and methods

Two types of poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) (PLATMC) were synthesized at the Centre of Polymer and Carbon Materials, PAScs in Zabrze. $Zr(Acac)_4$ was used as a low toxic initiator of the ring-opening copolymerization. The reaction was performed at $150^\circ C$ (P1) and $120^\circ C$ (P2) with the initiator to monomer molar ratio (I/M) of 1/1000. Paclitaxel (PTX) was purchased from LC Laboratories®.

Appropriate amount of copolymer and paclitaxel were dissolved separately in methylene chloride (DCM). Then the two solutions were mixed, degassed under reduced pressure and cast on Teflon plates. The films were dried at ambient temperature and under reduced pressure afterwards. 10 mm discs were cut from the films. Drug-free matrices were also prepared, according to the procedure described above.

Each kind of matrix: 0%, 3% and 5% of PTX was hermetically sealed and irradiated with the use of electron beam as well as gamma rays.

The samples were sterilized by an electron beam with the accelerating voltage of 10 MeV generated in the electron accelerator. ^{60}Co constituted the source of gamma rays and the dose rate equalled 8.28 kGy/h. Both sources of radiation delivered the radiation dose of 25 kGy.

Sterilized and non-sterilized matrices were studied by means of nuclear magnetic resonance (NMR), differential scanning calorimetry (DSC) and gel permeation chromatography (GPC).

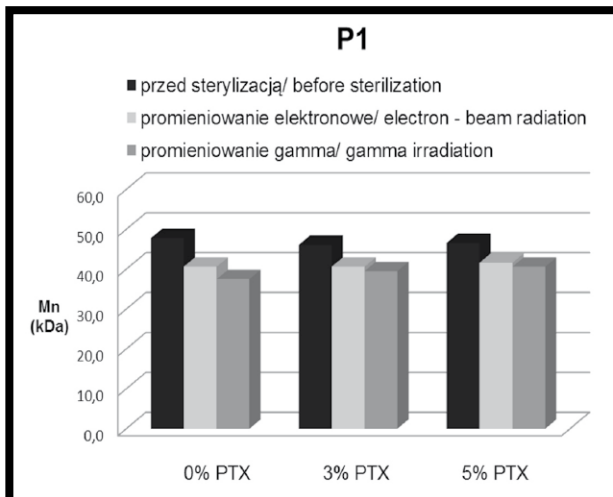
Gel permeation chromatograph (GPC, Physics SP 8800) was employed to study the number average molecular weight (M_n) and molecular weight dispersity (D). Chloroform was used as the solvent.

Thermal properties such as glass transition temperature (T_g), melting temperature (T_m) and melting enthalpy (ΔH_m) were estimated with the use of differential scanning calorimeter (TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE). The matrices were scanned twice in the range of $-50^\circ C$ to $200^\circ C$ (heating rate of $20^\circ C/min$). The samples were quenched to $-100^\circ C$ in liquid nitrogen in order to obtain amorphous copolymers. DSC was calibrated using high purity gallium and indium standards. T_m and ΔH_m was obtained from the first scan while T_g from the second scan.

The changes of copolymers composition, the average length of lactidyl ($^{(L)}$) and carbonate ($^{(C)}$) units were determined from 1H NMR spectra recorded at superconducting high-resolution nuclear magnetic resonance spectrometer – 600 MHz (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker). $CDCl_3$ was the solvent, tetrametylsilane (TMS) – the internal standard.

Celem niniejszej pracy było porównanie wpływu jonizacyjnych metod sterylizacji na bioresorbowalne matryce zawierające paklitaksel. Dwa rodzaje poli(L-laktydo-kowęgłanu trimetylenu) (PLATMC) zsyntezowane w różnych temperaturach: 150°C - P1 (75LA:25TMC) oraz w 120°C - P2 (74LA:26TMC) wykorzystano do przygotowania matryc z 3% oraz 5% paklitakselu, a także matryc niezawierających leku. Oba kopolimery składały się z laktydylowych, jak i węglanowych jednostek, lecz różniły się właściwościami fizykochemicznymi, takimi jak liczbowo średnia masa cząsteczkowa (M_n), rozrzut mas cząsteczkowych (D), temperatura zeszczenia (T_g) i temperatura topnienia (T_m). Kopolimery posiadały niemalże identyczny stosunek komonomerów oraz średnią długość bloków węglanowych, podczas gdy średnia długość bloków laktydylowych była odmienna. Dowiedziono, iż mikrostruktura łańcucha ma wpływ na degradację hydrolytyczną polimerów, ale również na profil uwalniania leku [6,7].

RYS. 1 i 2 prezentują M_n każdego typu matrycy przed i po procesie sterylizacji za pomocą wiązki elektronów oraz promieniowania gamma. Wszystkie badane materiały wykazywały spadek M_n bez względu na zawartość paklitakselu i metodę napromieniania. Jakkolwiek, nie zaobserwowano znaczących zmian w rozrzucie mas cząsteczkowych (D). Matryce napromieniane promieniami gamma charakteryzowały się nieznacznie niższymi masami cząsteczkowymi niż matryce sterylizowane EB. Wyższą utratę M_n obserwowano w przypadku matryc P2 (74LA:26TMC). Spadek M_n może wynikać z degradacji głównych łańcuchów spowodowanej radiacją [8]. Wszystkie matryce były hermetycznie zamknięte, dlatego też wyklucza się wpływ rodników tlenowych na degradację. Ponadto, spadek M_n matryc bez paklitakselu był nieco wyższy niż w matrycach z lekiem. Zjawisko to można tłumaczyć zmienioną organizacją łańcuchów polimerowych, wynikającą z obecności cząsteczek leku, a przez to większą ich odpornością na promieniowanie.

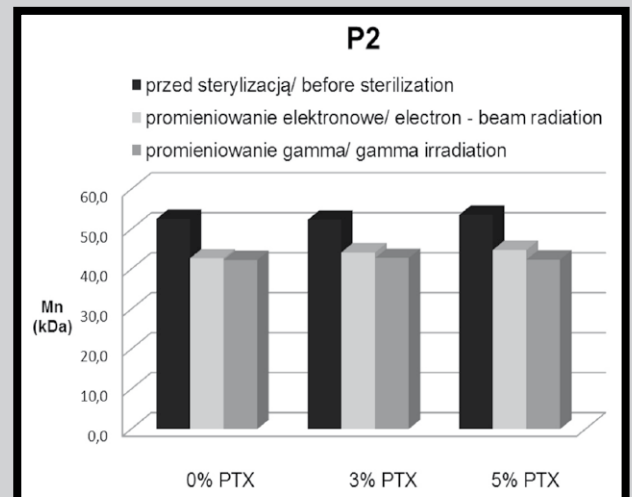


RYS. 1. Porównanie średnich liczbowo mas cząsteczkowych (M_n) matryc P1 (0%, 3% oraz 5% PTX) niesterylnych oraz poddanych sterylizacji wiązką elektronów i promieniowaniu gamma.

FIG. 1. Comparison of the number average molecular weight (M_n) of non-sterile P1 matrices (0%, 3% and 5% PTX) and matrices after electron beam radiation as well as gamma radiation.

The aim of this study was to compare the influence of ionizing methods of sterilization on paclitaxel-containing bioresorbable matrices. Two kinds of poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates) (PLATMC) synthesized at different temperatures: 150°C – P1 (75LA:25TMC) and 120°C – P2 (74LA:26TMC) were applied to prepare matrices with 3% and 5% of PTX as well as drug free matrices. Both copolymers consisted of lactidyl and carbonate units but differed in physicochemical properties such as the average molecular weight, polydispersity index, glass transition temperature (T_g) and melting temperature (T_m). The copolymers characterized almost the same comonomeric ratio and the average length of carbonate units before irradiation, while they varied in the average lengths of lactidyl units. It was reported that chain microstructure has an impact on hydrolytic degradation of polymers but also on drug release profile [6,7].

FIGs 1 and 2 present M_n changes of each kind of matrix before and after sterilization with the use of accelerated electrons and gamma rays. All of the studied materials showed decrease of M_n , regardless of paclitaxel content and methods of radiation. However, no significant changes of dispersity index (D) were observed. The gamma irradiated matrices exhibited slightly lower molecular weight than matrices sterilized with EB. Higher loss of molecular weight is observed in the case of P2 matrices (74LA:26TMC). The decrease of M_n can result from main-chain degradation caused by the radiation [8]. All of the matrices were hermetically packed thus the impact of free oxygen radicals on chain degradation was excluded [9]. Furthermore, M_n decrease of matrices without paclitaxel was slightly higher than drug-containing matrices. This occurrence may be explained by different arrangement of polymer chains due to the presence of drug molecules, which influenced their higher resistance to radiation.



RYS. 2. Porównanie średnich liczbowo mas cząsteczkowych (M_n) matryc P2 (0%, 3% oraz 5% PTX) niesterylnych oraz poddanych sterylizacji wiązką elektronów i promieniowaniu gamma.

FIG. 2. Comparison of the number average molecular weight (M_n) of non-sterile P2 matrices (0%, 3% and 5% PTX) and matrices after electron beam radiation as well as gamma radiation.

TABELA 1. Termiczna charakterystyka sterylnych i niesterylnych matryc.
TABLE 1. Thermal characteristic of sterile and non-sterile matrices.

Rodzaj matrycy Type of matrice	Przed sterylizacją Before sterilization			Po sterylizacji / After sterilization					
				EB			gamma		
	T_g [°C]	T_m [°C]		T_g [°C]	T_m [°C]		T_g [°C]	T_m [°C]	
P1 0% PTX	44.0	94.0		43.7	90.0		43.3	91.0	
	43.4	101.0		42.0	93.0		42.4	86.0	
	44.4	111.0		43.9	93.9		43.2	101.9	
P2 0% PTX	45.0	148.0	162.0	43.0	147.0	158.6	42.5	147.0	158.1
	46.5	143.0	158.6	44.2	143.9	158.6	44.0	147.6	158.0
	46.2	140.8	159.3	44.0	156.3	156.3	45.8	142.0	157.0

T_g - temperatura zeszczenia (drugi skan DSC) / glass-transition temperature (second DSC scan)
 T_m - temperatura topnienia (pierwszy skan DSC) / T_m - melting temperature (first DSC scan)

TABELA 2. Średnie długości bloków laktydylowych i węglanowych (l_{LL} i l_{TMC}) przed i po sterylizacji matryc P1 oraz P2.

TABLE 2. The average lengths of lactidyl and carbonate units (l_{LL} and l_{TMC}) before and after sterilization of P1 and P2 matrices.

Rodzaj matrycy Type of matrice	Przed sterylizacją / Before sterilization		Po sterylizacji / After sterilization			
			EB		gamma	
	l_{LL}	l_{TMC}	l_{LL}	l_{TMC}	l_{LL}	l_{TMC}
P1 0% PTX	3.11	1.04	3.10	1.03	3.06	1.02
	3.12	1.04	3.09	1.02	2.98	1.00
	3.11	1.04	3.07	1.03	3.06	1.00
P2 0% PTX	3.65	1.28	3.62	1.27	3.42	1.08
	3.39	1.19	3.25	1.08	3.24	1.02
	3.42	1.20	3.42	1.14	3.17	1.00

Analizy DSC ujawniły, iż matryce wykonane z P1 oraz P2 były semikrystaliczne, ponieważ wszystkie wykazywały endotermie topnienia i temperatury zeszczenia. Termiczna charakterystyka sterylnych i niesterylnych matryc prezentowana jest w TABELI 1. Matryce P2 cechowały się dwoma endotermami topnienia. Chociaż istnieje wiele wyjaśnień takiego zjawiska [10,11] założono, iż matryce P2 zawierały dwie różne formy krystaliczne. Wyższa T_m była prawdopodobnie związana z kryształami utworzonymi przez jednostki laktydylowe, a niższa T_m z kryształami zbudowanymi z jednostek laktydylowych oraz węglanowych.

Jako rezultat utraty M_n napromieniane matryce miały nieco niższe T_g , niż matryce przed napromienianiem. Ten efekt był bardziej widoczny w matrycach przygotowanych z P2. Temperatury topnienia matryc P1 oraz P2 były niższe po procesie radiacji. Całkowita ΔH_m wzrosła w matrycach P2 zawierających paklitaksel po obu typach promieniowania, podczas gdy spośród matryc P1 najwyższą ΔH_m obserwowano w matrycach napromienianych promieniami gamma (wyników nie pokazano), bez względu na zawartość leku.

Widma 1H NMR nie pokazały różnic w udziale jednostek komonomerycznych pomiędzy matrycami P1 przed i po sterylizacji. Napromieniane matryce P2 wyróżniały się wzrostem ilości jednostek laktydylowych i ubytkiem jednostek węglanowych, wartości te były nieznacznie wyższe dla matryc po sterylizacji promieniowaniem gamma. Matryce P1 i P2 cechowały się spadkiem średniej długości bloków laktydylowych l_{LL} oraz węglanowych l_{TMC} (TABELA 2). Średnie długości bloków były mniejsze po promieniowaniu gamma, co korespondowało z ubytkiem masy cząsteczkowej. Doniesiono, że promieniowanie gamma powoduje rozerwanie łańcuchów, przez co wpływa również na fizykochemiczne właściwości napromienianych polimerów [9]. Matryce zawierające lek były bardziej wrażliwe na radiację, ponieważ średnie długości bloków l_{LL} i l_{TMC} były mniejsze niż matryc bez leku. Jakkolwiek, cząsteczka leku nie uległa zmianie w czasie sterylizacji.

DSC analysis showed that P1 and P2 matrices were semicrystalline since all of them exhibited melting endotherms and glass transition temperatures. The thermal characteristics of sterile and non-sterile matrices are presented in TABLE 1. P2 matrices revealed two melting endotherms. Although there are many possible explanations of this phenomenon [10,11], it is assumed that P2 matrices contained two different crystalline forms. The higher T_m was probably concerned with crystals composed of lactidyl units, while lower T_m with crystals consisting of both lactidyl and carbonate units.

As a result of M_n decrease, the radiated matrices showed slightly lower T_g than non-radiated ones. This effect was more significant in the case of matrices obtained from P2. The melting temperatures of P1 and P2 matrices were lower after irradiation. Total ΔH_m of P2 matrices increased in drug-free matrices and decreased in matrices with paclitaxel after both types of radiation, while among P1 matrices the highest ΔH_m were observed in gamma irradiated matrices (data not shown), regardless of drug loading.

The 1H NMR spectra revealed no differences in comonomer molar ratio between all of the P1 matrices before and after sterilization. The P2 matrices distinguished lactidyl units content increase of and carbonate units content decrease after radiation and these values were slightly higher for matrices irradiated with gamma rays. P1 and P2 matrices showed decrease of the average length of lactidyl units l_{LL} after sterilization as well as the average length of carbonate units l_{TMC} (TABLE 2). The average block lengths were more reduced after gamma irradiation, which corresponded to the molecular weight loss of the studied matrices. It has been reported that gamma rays induce chain-scission and thus influence the physicochemical properties of irradiated polymers [9]. Drug-loaded matrices were more susceptible to radiation since the average block lengths were lower than l_{LL} and l_T of drug free matrices. However, the drug molecule did not change after sterilization.

Nie obserwowano znaczących różnic w składzie jednostek komonomerycznych matryc sterylnych i niesterylnych, zawierających lek i matryc bez leku. Obniżenie się temperatury zeszklenia T_g wynikało ze spadku średniej długości bloków laktydylowych i węglanowych oraz utraty M_n po procesie sterylizacji. Otrzymane wyniki pokazują, iż oba kopolimery były bardziej odporne na radiację wiązką elektronową. Mimo to, zauważalne były niewielkie różnice we właściwościach fizykochemicznych matryc sterylizowanych promieniami gamma i EB.

Wnioski

Dwa rodzaje kopolimerów wykorzystano do otrzymania matryc z 3% i 5% zawartością paklitakselu oraz matryc bez leku, które sterylizowano z użyciem wiązki elektronów oraz promieniowania gama. Dawka promieniowania wynosiła 25 kGy. Wiązka elektronów oraz promieniowanie gamma wpłynęły na średnią liczbowo masę cząsteczkową (M_n), właściwości termiczne oraz średnie długości bloków laktydylowych i węglanowych (f_{LL}^e , f_{TMC}^e). Obie metody sterylizacji spowodowały spadek wspomnianych parametrów. Mało istotne zmiany w stosunku komonomerów obserwowano jedynie w przypadku matryc P2. Zawartość paklitakselu spowodowała nieznacznie mniejszy ubytek masy cząsteczkowej i większy spadek średniej długości jednostek laktydylowych (f_{LL}^e) w porównaniu z matrycami bez leku. Uzyskane wyniki pokazują, iż napromienianie wiązką elektronową wydaje się być lepszą metodą sterylizacji poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny).

Przeprowadzone badania wskazują na konieczność wyboru odpowiedniej metody sterylizacji materiałów polimerowych, ponieważ podczas procesu sterylizacji może dojść do zmian w ich właściwościach fizykochemicznych. To z kolei determinuje zmiany w procesie degradacji i pośrednio wpływa na profil uwalniania substancji leczniczej.

Podziękowania

Pracę zrealizowano w ramach badań finansowanych przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (KNW-1-027/D/2/0) oraz Narodowe Centrum Nauki (NN 405 682 340).

No significant differences of comonomers' composition were observed in sterile and non-sterile matrices containing paclitaxel as well as drug free matrices. The decrease of the glass transition temperature (T_g) resulted from decrease of the average lactidyl and carbonate block length and the M_n loss after radiation. The obtained data showed that both copolymers were more resistant to EB radiation. Nevertheless, small dissimilarities of physicochemical features between gamma and EB radiated matrices were noticeable.

Conclusions

Two kinds of copolymers were used to obtain matrices with 3%, 5% of PTX and drug free matrices that were sterilized with the use of electron beam as well as gamma rays. The radiation dose was 25 kGy. Electron beam radiation and gamma rays influenced the number average molecular weight (M_n), thermal properties and the average length of lactidyl and carbonate units (f_{LL}^e , f_{TMC}^e). Both methods of sterilization caused decrease in all of the mentioned parameters. The insignificant changes of comonomeric ratios were observed only in P2 matrices. Paclitaxel content caused less significant molecular weight decrease and higher decrease of the average length of lactidyl units (f_{LL}^e) as compared to matrices without drug. The obtained data showed that electron beam radiation seems to be a better method of sterilization for poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates).

Research indicated the necessity of selecting an appropriate sterilization method of polymeric materials, since during the sterilization process some changes of their physicochemical properties may occur. This in turn determines the changes of the degradation process and indirectly affects the drug release profile.

Acknowledgments

This study has been financially supported by Medical University of Silesia in Katowice (Grant No: KNW-1-027/D/2/0) and National Science Centre (Grant No: NN 405 682 340).

Piśmiennictwo

- [1] Javeed A., Asharf M., Riaz A., Ghafoor A., Afzal S., Mukhtar M.M.: Paclitaxel and immune system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38 (2009) 283-290.
- [2] Kraitzer A., Kloog Y., Zilberman M.: Approaches for prevention of restenosis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 85B (2008) 583-603.
- [3] Nair L. S., Laurencin Ct.: Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762-798.
- [4] Edlund U., Albertsson A.-C.: Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery. *Advances in Polymer Science* 2002 (157) 67-112.
- [5] Mendes G.C.C., Brandão T.R.S., Silva C.L.M.: Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review, *American Journal of Infection Control* 35 (2007) 574-58.
- [6] Hua J., Gębarowska K., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Wei J., Li S.: Influence of chain microstructure on the hydrolytic degradation of copolymers from 1,3-trimethylene carbonate and L-lactide. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 47 (2009) 3869-3879.

References

- [7] Jelonek K., Kasperczyk J., Li S., Dobrzyński P., Jarząbek B.: Controlled poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) delivery system of cyclosporine A and rapamycin – the effect of copolymer chain microstructure on drug release rate. *International Journal of Pharmaceutics* 414 (2011) 203-209.
- [8] Loo S.C.J., Ooi C.P., Boey Y.C.F.: Radiation effects on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA). *Polymer Degradation and Stability* 83 (2004) 259-265.
- [9] Montanari L., Cilurzo F., Valvo L., et al.: Gamma irradiation effect on stability of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing clonazepam. *Journal of Controlled Release* 75 (2001) 317-330.
- [10] Qiu Z., Motonori Komura M., Takayuki Ikehara T., Toshio Nishi.: DSC and TMDSC study of melting behaviour of poly(butylene succinate) and poly(ethylene succinate). *Polymer* 44 (2003) 7781-7785.
- [11] Turska E., Janeczek H.: Liquid-induced crystallization of poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene ether). *Polymer* 19 (1978) 81-84.

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI TRIBOLOGICZNYCH I FIZYKOCHEMICZNYCH ŚLINY LUDZKIEJ I JEJ SUBSTYTUTÓW

EDYTA ANDRYSEWICZ*, JOANNA MYSTKOWSKA*,
JAN R. DĄBROWSKI, ELŻBIETA KRAWCZYK-DEMBICKA

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,
KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I BIOMEDYCZNEJ,
UL. WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK

* E-MAIL: EDICHEM@O2.PL; J.MYSTKOWSKA@PB.EDU.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań in vitro wybranych właściwości fizykochemicznych i tribologicznych śliny ludzkiej, własnych preparatów i handlowych substytutów śliny dostępnych na polskim rynku. Oceniano wartość pH, lepkość dynamiczną oraz współczynnik tarcia i zużycie objętościowe pary tribologicznej (szkliwo-ceramika korundowa) testowanej w środowisku ślin. Otrzymane wyniki badań wykazały różnice pomiędzy testowanymi preparatami w zakresie przeprowadzonych badań. Najlepszym z własnych preparatów, pod kątem właściwości tribologicznych, był roztwór mucyn typ III w buforowanym roztworze soli fizjologicznej.

Słowa kluczowe: ślina ludzka, substytut śliny, lepkość, współczynnik tarcia, zużycie

[Inżynieria Biomateriałów 118 (2013) 23-29]

Wprowadzenie

Zaburzenia czynności gruczołów ślinowych mogą powodować hiposalivację (zmniejszenie wydzielania śliny) lub kserostomię (suchość jamy ustnej), a nawet oba te schorzenia jednocześnie [1]. U pacjentów z tego typu dolegliwościami obserwuje się np. trudności w przyjmowaniu i połykaniu pokarmów, problemy z mową (konieczność ciągłego popijania wody), szybko postępującą próchnicę okrężną, skłonność do owrzodzeń błony śluzowej i wtórnych zakażeń bakteryjno-grzybiczych, suchość i zmiany zabarwienia błony śluzowej, atrofię brodawek, uczucie pragnienia, pieczenie śluzówki policzków, warg i języka, nieprawidłowe działanie bodźców smakowych, chrypkę, ból gardła i nieprzyjemny zapach z ust, zmianę składu i właściwości śliny czy zanik regeneracji uszkodzonych tkanek miękkich [1,2].

Niestety coraz częściej lekarze obserwują u pacjentów zaburzenia pracy gruczołów ślinowych, które wpływają na ilość wydzielanej śliny. Istnieje wiele czynników, które mogą prowadzić do przewlekłej suchości w ustach [1-10]. Wśród nich należy wymienić: długoterminowe stosowanie leków (np. o działaniu: moczopędnym, przeciwdepresyjnym, przeciwhistaminowym, neuroleptycznym), choroby ogólne (np. zaburzenia funkcji tarczycy, cukrzyca, sarkoidoza, stany psychodenne (lękowe, depresja endogenna), anemia mikrocytarna i deficyt Fe, awitaminozy (witaminy B2, B6), AIDS, guzy kąta mostowo-mózdkowego, odwodnienie (ludzie starsi), kolagenozy, grzybica jamy ustnej, choroby alergiczne) oraz radioterapię guzów głowy i szyi, a także czynniki miejscowe (palenie tytoniu, użytkowanie protez zębowych, oddychanie przez usta).

INVESTIGATIONS OF TRIBOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF HUMAN SALIVA AND ITS SUBSTITUTES

EDYTA ANDRYSEWICZ*, JOANNA MYSTKOWSKA*,
JAN R. DĄBROWSKI, ELŻBIETA KRAWCZYK-DEMBICKA

BIAŁYSTOK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,
DEPARTMENT OF MATERIAL AND BIOMEDICAL ENGINEERING,
WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK

* E-MAIL: EDICHEM@O2.PL; J.MYSTKOWSKA@PB.EDU.PL

Abstract

In this work, the results of in vitro studies of selected physical, chemical, and tribological properties of human saliva, self-made preparations, and commercial saliva substitutes available on the Polish market, have been presented. The pH value, absolute viscosity, as well as the friction coefficient and volumetric wear of the tribological pair tested in the environments of saliva and saliva substitutes were evaluated. The obtained results of studies showed differences between the tested preparations in the scope of the evaluated parameters. The best among the self-made preparations, in terms of tribological properties, was a type III mucin solution in a buffered saline solution.

Keywords: human saliva, saliva substitute, viscosity, friction coefficient, wear

[Engineering of Biomaterials 118 (2013) 23-29]

Introduction

Disorders of salivary gland functions may cause hyposalivation (a reduction of saliva secretion) or xerostomia (dryness of the oral cavity), or even both of these disorders at the same time [1]. In patients with this type of affection, the following symptoms can be observed: e.g. difficulty in ingestion and swallowing of food, problems with speech (necessity of constant drinking of water), highly progressing circumferential caries, a tendency for ulceration of the mucous membrane and secondary bacterial and fungal infections, dryness and discoloration of the mucous membrane, papillary atrophy, a sensation of thirst, stinging of the mucous membrane on the cheeks, lips, and tongue, abnormal response to taste stimuli, hoarseness, sore throat, and halitosis, a change in the composition and properties of saliva, or dwindling regeneration of damaged soft tissue [1,2].

Unfortunately, more and more often, doctors are observing salivary gland dysfunctions that affect the amount of secreted saliva in patients. There are many factors that can lead to chronic dryness of the mouth [1-10]. Among these factors, the following should be distinguished: long-term use of medication (e.g. with diuretic, anti-depressive, anti-histamine, or anti-psychotic effects), general diseases (e.g. thyroid dysfunction, diabetes, sarcoidosis, psychogenic states (anxiety, endogenous depression), microcytary anemia, and iron deficiency, avitaminosis (vitamins B2, B6), AIDS, cerebellopontine angle tumors, dehydration (older patients), collagenosis, oral mycosis, allergic diseases, and radiotherapy of cranial and cervical tumors, as well as local factors (tobacco use, use of dental prostheses, mouth breathing).

W wielu ośrodkach naukowych poszukuje się skutecznego sposobu leczenia zaburzeń czynności gruczołów ślinowych. Ślina jest ważnym płynem ustrojowym, składającym się z ponad 99% wody oraz niewielkiej ilości składników organicznych i nieorganicznych (około 1%). Ślina dzięki swoim właściwościom spełnia bardzo wiele ważnych funkcji w organizmie ludzkim [10,13-20]. Należą do nich m.in.: funkcja trawienna, funkcja ochronna (przeciwbakteryjna, przeciwwirusowa, przeciwgrzybiczna, antyoksydacyjna); funkcja wydalnicza, funkcja buforowa, funkcja demineralizacyjna, funkcja odżywcza, funkcja przewodzenia, czy ułatwianie wymawiania zgłosek. Ślina bierze również udział w regulowaniu gospodarki wodnej całego organizmu, nawilża znajdujące się w jamie ustnej tkanki miękkie, umożliwia szybkie wchłanianie przez błony śluzowe do krwi pewnych substancji chemicznych (piramidon, nitrogliceryna), uczestniczy w procesie poczucia smaku (woda, gustin). Wszystkie z wymienionych funkcji śliny mają istotny wpływ na użytkowanie protez zębowych. Badania Östlunda i Kawazoe zaprezentowane w pracy [9] wykazały zależność między właściwościami użytkowymi protez stomatologicznych, a jakością i ilością śliny ludzkiej.

Wśród rozlicznych funkcji, jakie pełni ślina w środowisku jamy ustnej, niezwykle ważny jest jej wpływ na procesy tarcia i zużycia kontaktujących się powierzchni zębów, wypełnień stomatologicznych oraz elementów protetyki stomatologicznej [21,22]. Proces zużywania elementów układu stomatognatycznego jest zjawiskiem niekorzystnym, gdyż może powodować zaburzenia w funkcjonowaniu stawów skroniowo-zuchwowych. Zmniejszona ilość śliny w jamie ustnej wpływa na wzrost intensywności zużycia szkliwa oraz materiałów stomatologicznych i protetycznych [22].

Leczenie zaburzeń wydzielania śliny może być miejscowe (stosowanie wazeliny, gliceryny, substytutów śliny) lub ogólnoustrojowe (stymulujące wydzielanie śliny - stosowanie leków: pilokarpina, cewimelina, betanechol, aminofostina) [2]. Prowadzone są też badania w kierunku poszukiwania substytutów naturalnej śliny. Preparaty te powinny zawierać takie składniki, które będą korzystnie wpływały m.in. na charakterystyki tribologiczne układu stomatognatycznego.

Na rynku farmaceutycznym oferowane są obecnie substytuty w postaci roztworów, aerozoli, żeli lub tabletek rozpuszczających. Preparaty te swoim składem chemicznym zbliżone są do składu ludzkiej śliny. Producenci, przy opracowywaniu nowych preparatów, koncentrują się głównie na takich ich właściwościach, które odpowiadają za: zniesienie uczucia suchości w ustach, zapewnienie wysokiej higieny i świeżości jamy ustnej, działanie bakteriobójcze, ochrona tkanek miękkich i zębów czy uzupełnianie brakujących składników obecnych w naturalnej ślinie. Niestety preparaty te wciąż daleko odbiegają od oryginału, szczególnie, jeżeli chodzi o właściwości tribologiczne.

Celem pracy była ocena w warunkach *in vitro* wybranych właściwości fizykochemicznych i tribologicznych śliny naturalnej, własnych oraz handlowych substytutów śliny dostępných na rynku polskim.

Materiały i metody badań

Badaniom poddano niestymulowaną ślinę mieszaną pobraną od pacjentów metodą wypluwania oraz własne i handlowe substytuty śliny. Skład własnych kompozycji opracowano w Katedrze Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej Politechniki Białostockiej. Dobór składników substytutów śliny opierał się na ich szerokim zastosowaniu w przemyśle farmaceutycznym (pasty do zębów, płyny do płukania ust, itp.) [20]. W skład pierwszego preparatu weszły trzy pirofosforany i guma ksantanowa.

An effective method of treatment of salivary gland dysfunctions is being sought for in many scientific centers. Saliva is an important bodily fluid, consisting of more than 99% water and a small amount of organic and inorganic ingredients (about 1%). Thanks to its properties, saliva fulfills many very important functions in the human body [10,13-20]. These are, among others: digestive function, protective function (anti-bacterial, anti-viral, antifungal, anti-oxidative); excretory function, buffering function, demineralizing function, nutritive function, conductive function, and facilitation of syllable pronunciation. Saliva also takes part in the body's water balance, moisturizes the soft tissue found in the oral cavity, enables rapid absorption of certain chemical substances (aminopyrine, nitroglycerin) into the blood through mucous membranes, and is also involved in the process of sensing taste (water, gustin). All of the functions of saliva listed above have a significant influence on the use of dental prostheses. Studies conducted by Östlund and Kawazoe present in work [9] showed a dependency between the utilitarian properties of dental prostheses and the quality and quantity of human saliva.

Among the manifold functions that saliva fulfills in the environment of the oral cavity, its influence on tribological and wear properties of contacting surfaces of teeth, dental fillings, and dental prosthetics elements are extraordinarily important [21,22]. The process of wearing of elements of the stomatognathic system is a disadvantageous phenomenon, because it may cause dysfunctions in the functioning of temporomandibular joints. The reduced amount of saliva in the oral cavity has an effect on the increase of the intensity of wear of enamel and dental and prosthetic materials [22].

Treatment of saliva secretion dysfunction can be [2] local (use of Vaseline, glycerin, saliva substitutes) or systemic (stimulation of saliva secretion – use of medication: pilocarpine, cevimeline, bethanecol, amifostine). Studies are also being conducted in the direction of searching for natural saliva substitutes. Such preparations should contain such ingredients that will have an advantageous influence on tribological properties of the stomatognathic system.

As of now, substitutes in the form of solutions, aerosols, gels, or dissolving pills are available on the pharmaceutical market. The chemical compositions of these preparations are similar to the composition of human saliva. When developing new preparations, manufacturers mainly focus on properties that are responsible for: alleviating the sensation of dryness in the mouth, ensuring good hygiene and freshness of the oral cavity, anti-bacterial action, protection of soft tissue and teeth, and supplementation of the missing ingredients that are present in natural saliva. Unfortunately, these preparations are still far from the original, especially in terms of tribological properties.

The purpose of this work was to evaluate selected physicochemical and tribological properties of human saliva, self-made preparations, and commercial saliva substitutes available on the Polish market under *in vitro* conditions.

Materials and methods

Unstimulated mixed saliva acquired from patients using a spitting method and self-made and commercial saliva substitutes were subjected to tests. The compositions of self-made preparations were developed at the Department of Materials and Biomedical Engineering of the Białystok Technical University. The selection of the ingredients of the saliva substitutes was based on the wide application of these ingredients in the pharmaceutical industry (toothpastes, mouthwashes, etc.) [20]. Three pyrophosphates and xanthan gum entered into the composition of the first preparation.

TABELA 1. Własne preparaty śliny.
TABLE 1. Self-made saliva substitutes.

L.p. No.	Roztwór Solution	Skład Composition
1.	Roztwór A Solution A	tetrasodu pirofosforan uwodniony (Sigma-Aldrich) + diwodorofosforan disodu (Sigma-Aldrich) + tetrapotasu pirofosforan (Sigma-Aldrich) + guma ksantanowa (Sigma-Aldrich) w PBS (buforowany roztwór soli fizjologicznej o pH = 7,0); tetra-sodium pyrophosphate hydrated (Sigma-Aldrich) + Di-sodium dihydrogen phosphate (Sigma-Aldrich) + tetra-potassium pyrophosphate (Sigma-Aldrich) + Xanthan gum (Sigma-Aldrich) in PBS (phosphate buffered saline) of pH = 7.0;
2.	Roztwór B Solution B	roztwór mucyn typu II (Sigma-Aldrich) w PBS of pH = 7,0 solution of type II mucins (Sigma-Aldrich) in PBS of pH = 7.0
3.	Roztwór C Solution C	roztwór mucyn typu III (Sigma-Aldrich) w PBS of pH = 7,0 solution of type III mucins (Sigma-Aldrich) in PBS of pH = 7.0
4.	Ludzka ślina Human saliva	ludzka ślina human saliva

TABELA 2. Handlowe substytuty śliny.
TABLE 2. Commercial saliva substitutes.

L.p. No.	Nazwa (producent) Name (manufacturer)	Wybrane składniki Selected ingredients
1.	Biotène Mouthwash (Laclede)	enzymy (laktoperoksydaza, oksydaza glukozy, lizozym), hydroksyetyloceluloza, ksylitol, wapń enzymes (lactoperoxidase, glucose oxidase, lysozyme), hydroxyethylcellulose, xylitol, calcium
2.	BioXtra – żel / BioXtra – Gel (Bio-X Healthcare)	bioaktywne enzymy, ksylitol, minerały, aloes, wapń, substancje nawilżające bioactive enzymes, xylitol, minerals, aloe, calcium, moisturizers
3.	BioXtra - płyn do płukania jamy ustnej BioXtra - mouthwash (Bio-X Healthcare)	bioaktywne enzymy, ksylitol, minerały, aloes, wapń, substancje nawilżające, fluor, olejki esencjonalne bioactive enzymes, xylitol, minerals, aloe, calcium, moisturizers, fluoride, essential oils
4.	Mucinox (Medac GmbH Sp. z o.o.)	sorbitol, ksylitol, wyciąg z Yerba Santa, kwas cytrynowy, naturalny aromat cytrynowy, kwas askorbinowy, benzoesan sodowy, wodorotlenek sodowy i regulator kwasowości sorbitol, xylitol, Yerba Santa extract, citric acid, natural lemon aroma, ascorbic acid, sodium benzoate, sodium hydroxide, and an acidity regulator
5.	Saliva rex (PATER Laboratory)	sól sodowa karboksymetylocelulozy, ksylitol, fluorek sodowy, jony wapnia, sok aloesowy sodium salt of carboxymethylcellulose, xylitol, sodium fluoride, calcium ions, aloe juice
6.	Vivo-dental (PATER Laboratory)	enzymy (laktoperoksydaza, oksydaza glukozowa, lizozym i laktoferyna) enzymes (lactoperoxidase, glucose oxidase, lysozyme, and lactoferrin)

W skład drugiego i trzeciego preparatu weszły naturalne mucyny zwierzęce, odpowiednio typ II i typ III. Wszystkie roztwory przygotowano na bazie roztworu PBS (buforowany roztwór soli fizjologicznej), zgodnie z TABELĄ 1.

W celu osiągnięcia powtarzalnych warunków badań ślinę naturalną pobierano według wcześniej opracowanej metodyki [23].

Spośród bardzo wielu ogólnie dostępnych na rynku farmaceutycznym preparatów do badań wybrano produkty przedstawione w TABELI 2.

W pracy przebadano pH, właściwości tribologiczne i reologiczne śliny naturalnej i jej substytutów.

Do oceny pH zastosowano analizator potencjometryczny firmy Orion.

Testy tribologiczne zostały przeprowadzone przy użyciu tribometru, z zastosowaniem geometrii pomiarowej typu trzpień-tarcza, którego widok przedstawia RYS. 1. Parę tribologiczną stanowił trzpień, wykonany ze szkliwa zęba zakończony ściętym stożkiem o kącie nachylenia tworzącej 20° i powierzchni ściętej wynoszącej około 1 mm² oraz tarcza o średnicy 25,4 mm i chropowatości R_a = 0,64, wykonana z ceramiki korundowej, przygotowana przez Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie. Środkiem smarnym była ślina ludzka i jej substytuty.

Natural mucins of animal origin were the ingredients of the second and third preparations – type II and type III, respectively. All solutions were prepared using a PBS base (buffered saline solution) according to TABLE 1.

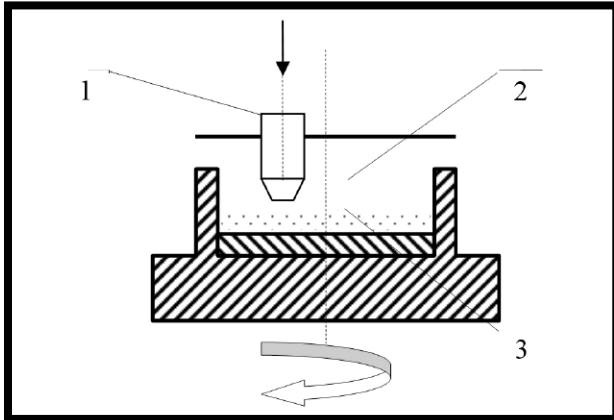
In order to achieve repeatable test conditions, natural saliva was acquired according to a pre-developed methodology [23].

Among the wide range of preparations generally available on the pharmaceutical market, the products presented in TABLE 2 were selected for tests.

The pH, tribological and rheological properties of natural saliva and its substitutes were studied in this work.

A potentiometric analyzer from the Orion Company was used to measure pH.

Tribological tests were conducted using a friction simulator, type pin-on-disc tester (FIG. 1). The friction pair consisted of a pin made from tooth enamel with a truncated cone ending with a slant height inclination angle of 20° and a truncated surface of approx. 1 mm² as well as a disc with a diameter of 25.4 mm and a coarseness of R_a = 0.64 made from corundum ceramics, prepared by the Institute of Ceramics and Building Materials in Warsaw. Human saliva and its substitutes were used as lubricants.



RYS. 1. Widok węzła tarcia: 1,3 - próbka, przeciwpróbka, 2 - środek smarny [25].

FIG. 1. A view of diagram of the friction node: 1,3 - sample and countersample, 2 - lubricant [25].

Do przygotowania trzpieni w postaci szkliva wykorzystano świeże, zdrowe zęby, które zostały usunięte pacjentom w wieku 18-35 lat, ze wskazań ortodontycznych. Przyjmuje się, że właściwości tribologiczne twardych tkanek w tym przedziale wiekowym praktycznie się nie zmieniają [24]. Wybór formy i geometrii próbek szkliva dobrany został w oparciu o metodykę badań tego typu materiałów, zaproponowaną w pracy [22]. Próbkę przechowywano maksymalnie dwa tygodnie w temperaturze około 5°C w roztworze Hanksa.

Na podstawie badań wstępnych oraz doniesień literaturowych [22] przyjęto następujące parametry badań tribologicznych: prędkość tarcia $v = 0,1$ m/s; promień tarcia $r = 8$ [mm]; prędkość obrotowa przeciwpróbki (tarczy) $n = 120$ obr/min; średnica powierzchni czołowej próbki $\varphi = 1$ mm; nacisk jednostkowy w strefie tarcia: 20 MPa; czas tarcia pojedynczej próby $t = 3$ h (180 min); objętość środka smarnego $V = 5$ cm³.

W celu wyznaczenia zużycia objętościowego przed i po zakończeniu badań tribologicznych mierzono średnice wierzchołków próbek za pomocą mikroskopu uniwersalnego Carl Zeiss Jena 2116.

Lepkość dynamiczną wyznaczono za pomocą lepkościomierza Brookfielda z zastosowaniem układu pomiarowego typu stożek-płytkę. Badania wykonano w temperaturze 37°C.

Wyniki i dyskusja

W TABELI 3 przedstawiono wartości pH badanych preparatów śliny, natomiast na RYS. 2-7 zaprezentowano charakterystyki zmian lepkości dynamicznej przy różnych prędkościach ścinania oraz charakterystyki tribologiczne. Końcowe wyniki wszystkich badań są wartością średnią z trzech prób przeprowadzonych w tych samych warunkach pomiarowych.

Z TABELI 3 można wywnioskować, że średnie wartości pH nie dla wszystkich preparatów mieszczą się w przedziałach uznawanych za prawidłowe dla śliny ludzkiej. Najniższą wartość pH posiadały preparaty: Biotène Moutwash i Mucinox (odpowiednio pH = 4,8 i pH = 5,4). Nieco wyższe wartości pH wykazały preparaty Vivo-dental i Saliva rex (odpowiednio pH = 6,4 i pH = 6,9). Najwyższe wartości pH wśród handlowych preparatów wykazały produkty BioXtra (pH = 7,2). Preparaty o niskich wartościach tego parametru mogą być stosowane tylko przez osoby nie posiadające własnego uzębienia, gdyż niskie wartości pH sprzyjają rozwojowi próchnicy. Wartość pH śliny ludzkiej u zdrowego człowieka wynosi w granicach pH = 6,8-7,2. Wartość pH wszystkich trzech własnych kompozycji (pH = 7,0) mieści się w przedziale pH śliny naturalnej, uznawanego przez lekarzy za prawidłowy.

Fresh and healthy teeth extracted from patients ages 18-35 due to orthodontic indications were used to prepare enamel pins. It is accepted that the tribological properties of hard tissue in this age interval are practically unchanging [24]. The selection of the form and geometry of enamel samples was made on the basis of the test methodology for this type of materials proposed in [22]. Samples were stored for a maximum time of two weeks at a temperature of approx. 5°C in Hank's solution.

On the basis of preliminary studies and literature data [22], the following parameters of tribological tests were accepted: friction rate $v = 0.1$ m/s; friction radius $r = 8$ mm; rotational speed of the countersample (disc) $n = 120$ rpm; diameter of the sample face surface $\varphi = 1$ mm; pressure applied to the sample - 20 MPa; friction time of a single test $t = 3$ h (10800 s); volume of lubricant $V = 5$ cm³.

Before and after friction tests were conducted, the diameters of sample tips were measured using a Carl Zeiss Jena 2116 universal microscope for the purpose of determining the volumetric wear.

Absolute viscosity was determined using a Brookfield viscosimeter with the application of a cone-disk type measuring system. Studies were conducted at a temperature of 37°C.

Results and discussion

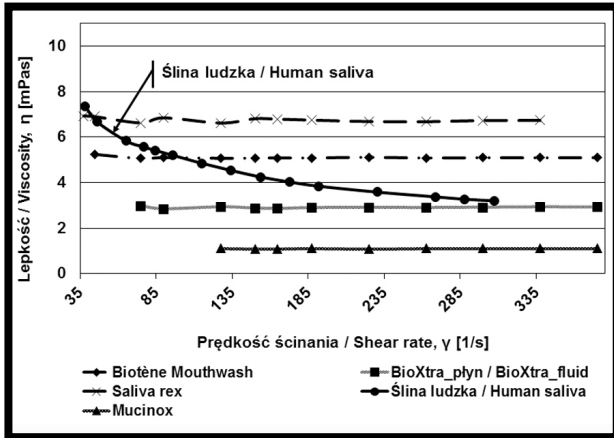
TABLE 3 presents the pH values of tested saliva preparations, and FIGs. 2-7 show curves of changes of viscosity for different shear rates and friction curves. Results presented in this work are the mean value of three measurements obtained at the same research conditions.

It can be concluded from the results in TABLE 3, that the average pH values do not necessarily fall within the ranges recognized as correct for human saliva for all of the preparations. The Biotène Moutwash and Mucinox preparations had the lowest pH values (pH = 4.8 and pH = 5.4, respectively). The Vivo-dental and Saliva rex preparations had somewhat higher pH values (pH = 6.4 and pH = 6.9, respectively). BioXtra products had the highest pH values among the commercial preparations (pH = 7.2). Preparations with low pH values can be used by persons without their own set of teeth, because low pH values favor the development of tooth decay. The pH value of human saliva in a healthy human is within the range of pH = 6.8-7.2. The pH value of all three of the self-made compositions (pH = 7.0) is within the pH range of natural saliva recognized by doctors as correct.

TABELA 3. Zestawienie wartości pH dla śliny naturalnej i jej substytutów.

TABLE 3. pH values of human saliva and its substitutes.

L.p. No	Badana substancja Tested substance	pH
1.	Saliva rex	6.9
2.	Vivo-dental	6.4
4.	Mucinox	5.4
5.	BioXtra - płyn do płukania jamy ustnej BioXtra - mouthwash	7.2
6.	BioXtra - żel / BioXtra - gel	7.2
7.	Biotène Mouthwash	4.8
8.	Ślina ludzka	6.8-7.2
9.	Roztwór A	7.0
10.	Roztwór B	7.0
11.	Roztwór C	7.0



RYS. 2. Lepkość śliny ludzkiej i jej handlowych substytutów.
FIG. 2. Viscosity of human saliva and its commercial substitutes.

Kolejny etap badań objął badania reologiczne. Na RYS. 2 przedstawiono wartość lepkości dynamicznej η (mPas) w funkcji prędkości ścinania γ [1/s] dla śliny ludzkiej i preparatów handlowych.

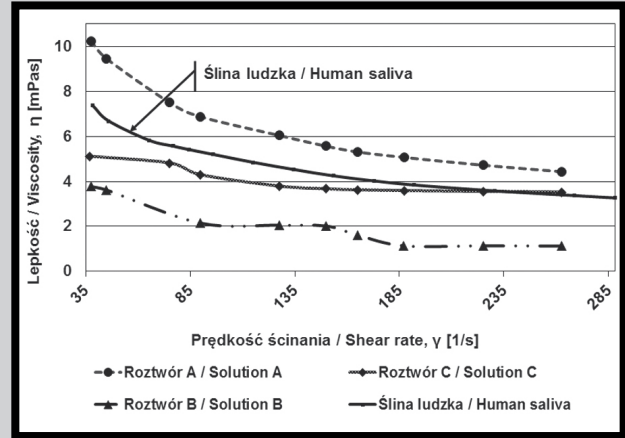
Jak wynika z RYS. 2 najniższą wartość lepkości dynamicznej uzyskano dla preparatu Mucinox (~1 mPas), a najwyższą wartość dla preparatu Saliva rex (~7 mPas). Preparaty Biotène Mouthwash i BioXtra charakteryzują lepkości znajdujące się w przedziale 1-7 mPas.

Z kolei analiza lepkości własnych preparatów ślin wykazała (RYS. 3), że najniższą lepkość ma roztwór na bazie mucyn typ II w roztworze PBS, a najwyższą lepkość roztwór pirofosforanów z dodatkiem gumy ksantanowej. Roztwór mucyn typ III w PBS charakteryzuje lepkość najbardziej zbliżona do lepkości śliny ludzkiej.

Analiza RYS. 2 i 3 uwidacznia, że wszystkie handlowe preparaty śliny wykazały właściwości cieczy newtonowskiej, natomiast ślina ludzka i własne kompozycje ślin – właściwości cieczy nienuetonowskiej. Lepkość badanych roztworów jest bardzo zróżnicowana i zależy przede wszystkim od ich składu chemicznego.

Drugim zasadniczym elementem pracy są badania tribologiczne. Na RYS. 4 przedstawiono zmiany wartości współczynnika tarcia w czasie. Z badań tych wynika, że najwyższe współczynniki tarcia wśród testowanych handlowych substytutów śliny wykazały preparaty Mucinox i BioXtra (~0,30). Najniższy zaś – Biotène Mouthwash (~0,21). Preparat Vivo-dental wykazał najniższy współczynnik tarcia wśród testowanych preparatów (~0,15) po 3 godzinach tarcia. Substytut ten charakteryzował wysoki współczynnik tarcia (~0,25) na początku procesu tarcia, który w miarę postępu procesu tarcia obniżył się do (~0,15). Ta ostatnia wartość odpowiadała jednocześnie wartości współczynnika tarcia w środowisku naturalnej śliny ludzkiej.

Na RYS. 5 przedstawiono wartości zużycia objętościowego pary tarciowej szklivo-ceramika korundowa, poddanej procesom tarcia w środowisku śliny naturalnej i jej handlowych substytutów. W tym przypadku najniższe zużycie objętościowe pary tarciowej (~0,011 mm³) uzyskano dla procesu tarcia prowadzonego w środowisku śliny naturalnej. Najwyższe zużycie pary tarciowej uzyskano dla przypadku tarcia w środowisku preparatu Mucinox (~0,58 mm³). Na podstawie analizy wyników badań stwierdzono, że dla pary tarciowej szklivo-ceramika korundowa wszystkie handlowe substytuty śliny w porównaniu z ludzką śliną wykazały gorsze właściwości tribologiczne (wyższy współczynnik tarcia i wyższe zużycie liniowe).



RYS. 3. Lepkość śliny ludzkiej oraz własnych kompozycji substytutów śliny ludzkiej.
FIG. 3. Viscosity of human saliva and self-made compositions of human saliva substitutes.

The next stage of tests included rheological tests. FIG. 2 shows the value of absolute viscosity η (mPas) as a function of shear rate γ [1/s] for human saliva and four commercial preparations. It was not possible to determine the viscosity of all commercial substitutes due to the fact that their viscosity was outside the measuring range of available spindles of the device used for testing.

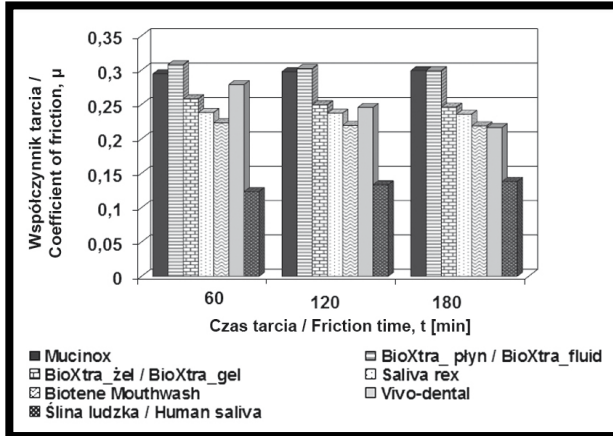
As results from FIG. 2, the lowest absolute viscosity value was obtained for the Mucinox preparation (~1 mPas) and the highest for the Saliva rex preparation (~7 mPas). The Biotène Mouthwash and BioXtra preparations are characterized by viscosities within the range of 1-7 mPas.

In turn, analysis of the viscosity of self-made saliva substitutes showed (FIG. 3) that the mucin type II-based solution in PBS, has the lowest viscosity, and the pyrophosphate solution with the addition of xanthan gum has the highest viscosity. The mucin solution, type III in PBS, is characterized by a viscosity that is the most similar to the viscosity of human saliva.

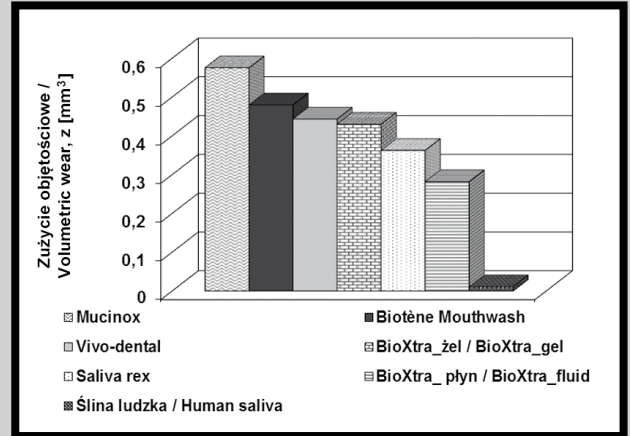
Analysis of FIGs. 2 and 3 makes it clear, that all commercial saliva preparations exhibited the properties of a Newtonian fluid; however human saliva and self-made saliva compositions had Non-Newtonian fluid properties. The viscosity of the studied solutions is varied and dependent, above all, on their chemical composition.

The second essential element of the work was tribological testing. FIG. 4 presents changes of the friction coefficient over time. It results from these studies, that Mucinox and BioXtra exhibited the highest friction coefficients (~0.30) among the tested commercial saliva substitutes. The lowest value of friction coefficient was observed for Biotène Mouthwash solution (~0.21). The Vivo-dental substitute exhibited the lowest friction coefficient (~0.15) among tested commercial saliva substitutes at 3 hours of friction. This preparation was characterized by a high friction coefficient (~0.25) at the beginning of the friction process, which was reduced to (~0.15) as the friction process continued. The latter value corresponds to the friction coefficient value in the environment of human saliva.

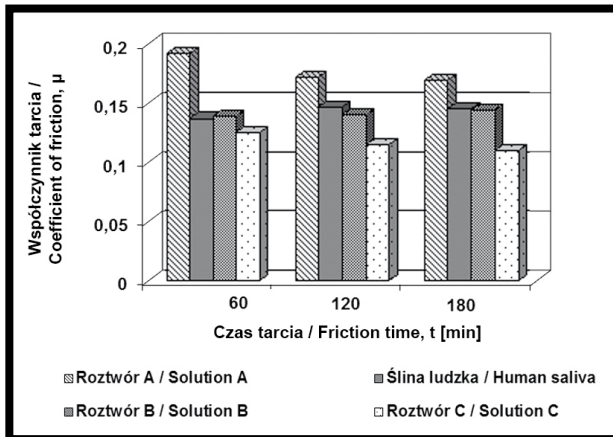
FIG. 5 shows the values of volumetric wear of the enamel-ceramic friction pair subjected to friction processes in the environment of natural saliva and its commercial substitutes. In this case, the lowest volumetric wear of the friction pair (~0.011 mm³) was achieved for the friction process conducted in the environment of natural saliva. The highest wear of the friction pair was achieved in the case of friction in the environment of Mucinox preparations (~0.58 mm³).



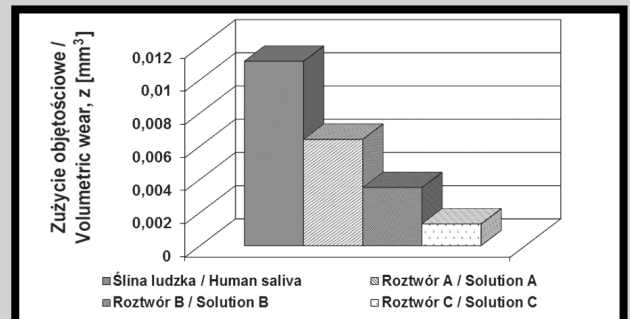
RYS. 4. Współczynnik tarcia w czasie dla pary tribologicznej szklivo-ceramika korundowa w środowisku handlowych substytutów śliny.
FIG. 4. Friction coefficient over time for the enamel-corundum ceramics friction pair in the environment of commercial saliva substitutes.



RYS. 5. Zużycie objętościowe po 180 minutach dla pary tribologicznej szklivo-ceramika korundowa w środowisku handlowych substytutów śliny.
FIG. 5. Volumetric wear after 180 minutes of friction for the enamel-corundum ceramics friction pair in the environment of commercial saliva substitutes.



RYS. 6. Współczynnik tarcia w czasie dla pary tribologicznej szklivo-ceramika korundowa w środowisku substytutów śliny.
FIG. 6. Friction coefficient over time for the enamel-corundum ceramics friction pair in the environment of saliva substitutes.



RYS. 7. Zużycie liniowe po 180 minutach tarcia dla pary tribologicznej szklivo-ceramika korundowa w środowisku trzech substytutów śliny.
FIG. 7. Volumetric wear after 180 minutes of friction for the enamel-corundum ceramics friction pair in the environment of three saliva substitutes.

Przeprowadzono także badania tribologiczne w środowisku własnych preparatów sztucznej śliny. Jak wynika z RYS. 6, najniższy współczynnik tarcia ($\sim 0,12$) wykazał roztwór mucyn typ III w PBS, a najwyższy współczynnik tarcia ($\sim 0,17$) otrzymano dla roztworu pirofosforanów z dodatkiem gumy ksantanowej.

Na RYS. 7 przedstawiono wyniki pomiaru zużycia objętościowego pary tarciowej szklivo-ceramika korundowa testowanych w środowisku własnych substytutów śliny. Wyniki tych badań są dość zaskakujące, bowiem po 3 godzinach tarcia, najwyższą wartość zużycia ($\sim 0,011 \text{ mm}^3$) zanotowano dla śliny ludzkiej, a najniższą dla roztworu mucyn typ III w roztworze PBS ($\sim 0,0013 \text{ mm}^3$). Wyjaśnienie tych obserwacji wymaga dodatkowych badań wykraczających poza zakres tej pracy.

Wnioski

Ocena pH oraz badania właściwości reologicznych i tribologicznych dla własnych i handlowych substytutów śliny uwiaryściły różnice ich właściwości użytkowych pomiędzy sobą i w porównaniu do śliny naturalnej.

On the basis of analysis of test results, it was stated, that for the enamel-corundum ceramics friction pair, all commercial saliva substitutes exhibited worse tribological properties (higher friction coefficient and higher linear wear) in comparison with human saliva.

Friction tests were also conducted in the environment of self-made artificial saliva preparations. As results from FIG. 6, the lowest friction coefficient ($\sim 0,11$) was exhibited by the type III mucin solution in PBS, and the highest friction coefficient ($\sim 0,17$) was obtained for the pyrophosphate solution with the addition of xanthan gum.

FIG. 7 presents the results of volumetric wear measurements of the enamel-corundum ceramics friction pair tested in the environment of self-made saliva substitutes. In this case, after 3 hours of friction, the greatest wear value ($\sim 0,011 \text{ mm}^3$) was recorded for human saliva and the lowest for the type III mucin solution in PBS ($\sim 0,0013 \text{ mm}^3$). Future investigations are needed in order to explain this phenomenon.

Conclusions

Studies of the physicochemical and tribological properties of own-prepared and commercial saliva substitutes made the differences of utilitarian properties between them and in comparison with natural saliva apparent.

Przeprowadzone badania oraz analiza literaturowa pozwoliły na opracowanie własnych substytutów śliny. Odpowiednio dobrane składniki zapewniają korzystne pH roztworów oraz korzystne charakterystyki tribologiczne i reologiczne.

Przeprowadzone badania potwierdzają konieczność prowadzenia dalszych testów badawczych w kierunku poszukiwania nowych preparatów ślin o lepszych właściwościach niż obecnie dostępnych produktów handlowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski końcowe:

1. Substytut śliny zawierający mucynę typ III w roztworze PBS wykazał najlepsze właściwości tribologiczne (najniższy współczynnik tarcia i najniższe zużycie liniowe pary tarciowej szkliwo-ceramika korundowa).

2. Najniższe wartości lepkości dynamicznej, w przypadku preparatów handlowych zaobserwowano dla płynu Mucinox, a najwyższe dla płynu Saliva rex.

3. Najwyższe wartości lepkości dynamicznej, w przypadku preparatów własnych zaobserwowano dla roztworu pirofosforanów z dodatkiem gumy ksantanowej, a najniższe dla roztworu mucyn typ II, przygotowanych roztworze PBS.

4. Badania pH testowanych handlowych i własnych preparatów śliny wykazały, że jego wartości odpowiadają pH śliny naturalnej:

- w przypadku płynów handlowych – tylko dla Saliva rex i Bioextra,

- w przypadku płynów własnych – dla wszystkich testowanych układów.

Podziękowanie

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010-2013 jako projekt badawczy numer N N507 592938.

The conducted studies and analysis of the literature made it possible to develop self-made saliva substitutes. The appropriately selected ingredients provide a beneficial pH of solutions and beneficial tribological and rheological characteristics.

The conducted studies confirm the necessity of further research being carried out in the direction of searching for new saliva preparations with better properties than the currently available commercial products.

On the basis of the results of the performed research, the following general conclusions can be made:

1. The saliva substitute containing type III mucin in PBS exhibited the best tribological properties (the lowest friction coefficient and the lowest linear wear of the enamel-corundum ceramics friction pair).

2. The lowest values of absolute viscosity in the case of commercial preparations were observed for the Mucinox fluid and the highest were observed for the Saliva rex fluid.

3. The highest values of absolute viscosity in the case of self-made preparations were observed for the pyrophosphate solution with the addition of xanthan gum and the lowest were observed for the type II mucin solution in PBS.

4. pH measurements of the tested commercial and self-made saliva preparations showed that the pH values of these preparations correspond to the pH of natural saliva:

- in the case of commercial fluids – only for Saliva rex and Bioextra,

- in the case of self-made fluids – for all tested solutions.

Acknowledgement

This scientific work is financed from research funds for the years 2010-2013 as a research project N N507 592938.

Piśmiennictwo

- [1] Fejerskov O., E. Kidd pod red. Kaczmarek U.: Próchnica zębów – choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2006.
- [2] Kamysz W., Okrój M., Łukasiak J., Kędzia A.: Histałiny- białka ślinowe bogate w histydynę. Nowa Stomatologia 27(1) (2004) 43-45.
- [3] Cichoński T., Litwin A.J., Mirecka J.: Kompendium histologii, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2002.
- [4] Iwankiewicz S.: Choroby gruczołów ślinowych, <http://www.wydawnictwoapteka.pl/>
- [5] Pawlik A.: Stres a jama ustna, <http://www.pracaizdrowie.com.pl>
- [6] Leppert W., Kozikowska J., Łuczak J., Głowacka A., Malinger S.: Objawy ze strony układu pokarmowego u chorych z zaawansowaną chorobą nowotworową. Nowa Medycyna 1 (2000) 18-39.
- [7] Paszyńska E.: Wybrane czynniki wpływające na wydzielanie i skład śliny. Dental Forum 1 (2005) 86-90.
- [8] Ciężka E., Surdacka A.: Rola śliny w procesie stresu oksydacyjnego - przegląd piśmiennictwa. Dental Forum 1 (2007) 53-57.
- [9] Pichór A., Doboszyńska A.: Suchość jamy ustnej - niedoceniany problem kliniczny. Medycyna Paliatywna w Praktyce 2 (2008) 26-28.
- [10] Lachowicz L., Turska E.: Biochemia jamy ustnej. Wyd. Lekarskie PZWL 2008.
- [11] Spiechowicz E.: Protetyka stomatologiczna. PZWL, Warszawa 2010.
- [12] Nieuw Amerongen A.V., Veerman E.C.I.: Saliva - the defender of the oral cavity. Oral Diseases 8 (2002) 12-22.
- [13] Dodds M.W.J., Johnson D.A., Yeh C.K.: Health benefits of saliva: a review. J. Dent. 33 (2005) 223-233.
- [14] Rantonen P.: Salivary flow and composition in healthy and diseased adults. University of Helsinki, Helsinki 2003.

References

- [15] Brosky M.E.: The role of saliva in oral health: Strategies for prevention and management of xerostomia. J. Support. Oncol. 5, 5 (2007) 215-225.
- [16] Jankowska A.K., Waszkiel D., Kowalczyk A.: Ślina jako główny składnik ekosystemu jamy ustnej, Część I. Mechanizm wydzielania i funkcje. Wiadomości Lekarskie 60 (2007) 148-154.
- [17] Jankowska A.K., Waszkiel D., Kobus A., Zwierz K.: Ślina jako główny składnik ekosystemu jamy ustnej, Część II. Mechanizmy odpornościowe. Wiadomości Lekarskie 60 (2007) 253-257.
- [18] Król K., Grocholewicz K.: Wybrane białka śliny jako biomarkery miejscowych i ogólnych procesów chorobowych. Przegląd piśmiennictwa. Pomorska Akademia Medyczna 53, I (2007) 78-82.
- [19] Szymczyk-Wasiluk T.: Biochemia. Kurs praktyczny, Dział Wydawnictw Akademii Medycznej, Warszawa 2001.
- [20] Kaczmarek U.: Suchość jamy ustnej - etiologia, częstość występowania i rozpoznanie - na podstawie piśmiennictwa, Czasopismo Stomatologiczne LX (2007) 20-31.
- [21] Sajewicz E.: Effect of saliva viscosity on tribological behaviour of tooth enamel. Tribology International 42, II (2009) 327-332.
- [22] Sajewicz E.: Tribologiczne aspekty funkcjonowania narządu zębowego człowieka. Wyd. PB, Białystok 2007.
- [23] Andrysewicz E., Dąbrowski J.R., Leonow G.: Aspekty metodyczne badań reologicznych śliny. Twój Prz. Stomatol., Z. temat. (2008) 10-15.
- [24] Zheng J., Zhou Z.R.: Effect of age on the friction and wear behaviors of human teeth. Tribology Int 39 (2006) 266-273.
- [25] Andrysewicz E., Mysłkowska J., Kolmas J., Jałbrzykowski M., Olchowski R., Dąbrowski J.R.: Influence of artificial saliva compositions on tribological characteristics of Ti-6Al-4V implant alloy. Acta of Bioengineering and Biomechanics 14, 4 (2012) 71-79.

ROLA POWIERZCHNI I STRUKTURY W POCZĄTKOWYM UWALNIANIU RYSPERYDONU Z MATRYC L-PLGA I D,L-PLGA

ARTUR TUREK^{1,2*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
KATARZYNA JELONEK², PIOTR DOBRZYŃSKI²,
JOANNA WALICHIEWICZ¹, KATARZYNA KRZEMIŃSKA¹,
ANNA SMOLA², MONIKA MUSIAŁ-KULIK²,
ANDRZEJ MARCINKOWSKI², MARCIN LIBERA²,
KATARZYNA GĘBAROWSKA², HENRYK JANECEK²

¹ ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, KATEDRA BIOFARMACJI,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC

² CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
POLSKA AKADEMIA NAUK,
UL. M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE

* E-MAIL: A.TUREK75@GMAIL.COM

Streszczenie

W niniejszej pracy była opracowywana implantacyjna postać leku zawierająca rysperydon wytworzona z poli(L-laktydo-ko-glikolidu) (L-PLGA) oraz poli(D,L-laktydo-ko-glikolidu) (D,L-PLGA) zastosowanych jako nośniki leku. Ustalano wpływ właściwości powierzchniowych i strukturalnych na początkowe uwalnianie rysperydonu podczas pierwszych 24 godzin inkubacji. W tym celu zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową, spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego, skaningową kalorymetrię różnicową, skaningowy mikroskop elektronowy oraz mikroskop sił atomowych. We wszystkich analizowanych danych zaobserwowano różnice pomiędzy matrycami wykonanymi z L-PLGA, a matrycami sporządzonymi z D,L-PLGA. Nie wykazano efektu wyrzutu dla żadnego z badanych polimerów, jakkolwiek ilość uwolnionego leku w przypadku matryc D,L-PLGA była prawie pięciokrotnie wyższa. Kopolimer L-PLGA charakteryzował się znacząco większą średnią długością bloków laktydylowych i glikolidylowych niż D,L-PLGA. Co więcej, zaobserwowano inny charakter powierzchni analizowanych matryc, to znaczy w przypadku L-PLGA powierzchnia była porowata, podczas gdy w przypadku D,L-laktydu nie obserwowano perforacji. Niewątpliwie istnieje zależność między początkowym uwalnianiem rysperydonu, a topografią i strukturą matryc polimerowych. Przypuszcza się, że większe uwalnianie leku z L-PLGA było bardziej związane z właściwościami powierzchniowymi niż ze strukturą matryc. Otrzymane wyniki wskazują na ogromny potencjał obu tych polimerów i możliwość wybrania optymalnego materiału.

Słowa kluczowe: rysperydon, implantacyjne nośniki leków, poli(L-laktyd-ko-glikolid), poli(D,L-laktyd-ko-glikolid), początkowe uwalnianie

[Inżynieria Biomateriałów 118 (2013) 30-36]

ROLE OF SURFACE AND STRUCTURE IN THE INITIAL RELEASE OF RISPERIDONE FROM L-PLGA AND D,L-PLGA MATRICES

ARTUR TUREK^{1,2*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
KATARZYNA JELONEK², PIOTR DOBRZYŃSKI²,
JOANNA WALICHIEWICZ¹, KATARZYNA KRZEMIŃSKA¹,
ANNA SMOLA², MONIKA MUSIAŁ-KULIK²,
ANDRZEJ MARCINKOWSKI², MARCIN LIBERA²,
KATARZYNA GĘBAROWSKA², HENRYK JANECEK²

¹ MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

² CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
M.CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: A.TUREK75@GMAIL.COM

Abstract

In this work, implantable drug formulation with risperidone on the basis of poly(L-lactide-co-glycolide) (L-PLGA) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) (D,L-PLGA) as drug carriers has been developed. The influence of surface and structural properties on the initial release of risperidone during the first 24 hours has been determined. In this aim, high-performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, differential scanning calorimetry, scanning electron microscope and atomic force microscope were used. The differences between L-PLGA and D,L-PLGA matrices in all analyzed data were noted. The burst effect was not revealed for any of the studied polymers, however the released drug was almost five times larger for D,L-PLGA matrices. The L-PLGA copolymer revealed a significantly longer average length of the lactidyl and glycolidyl blocks than D,L-PLGA. Moreover, various characters of surface for analyzed matrices were shown, i.e. in the case of L-PLGA the surface was porous and in the case of D,L-PLGA it was nonporous. Undoubtedly, there were dependences between risperidone's initial release and the topography and the structure of polymeric matrices. We suppose that the larger drug release for L-PLGA was more associated with surface properties than with structure of matrices. The obtained results show the great potential of both polymers and possibility to choose the optimal material.

Keywords: risperidone, implantable drug carriers, poly(L-lactide-co-glycolide), poly(D,L-lactide-co-glycolide), initial release

[Engineering of Biomaterials 118 (2013) 30-36]

Wprowadzenie

Według danych literaturowych, schizofrenia dotyka znaczącej części światowej populacji (0,3-0,7%) [1,2]. Wiele neuroleptyków w różnych postaciach znalazło zastosowanie w leczeniu schizofrenii [3-6]. Jednym z nich był rysperydon, stosowany klinicznie od późnych lat osiemdziesiątych [7,8]. Przez ostatnie dwie dekady w celu zwiększenia biodostępności rysperydonu i zmniejszenia jego szeroko rozumianych działań niepożądanych proponowano wiele postaci zawierających tą substancję leczniczą. Należały do nich tradycyjne tabletki doustne i tabletki ulegające rozpadowi w jamie ustnej, roztwory i długo działające iniekcje [9-12]. Bez względu na punkt widzenia, wspomniane powyżej postaci leku posiadają mniejsze lub większe wady. Największą wadą postaci doustnych wydaje się być konieczność ich regularnego codziennego przyjmowania. Alternatywnym rozwiązaniem dla tradycyjnych preparatów są długo działające iniekcje. Komercyjnie dostępny produkt leczniczy zawierający rysperydon w formie długo działającej iniekcji zawiera enkapsułkowane mikrosfery wytworzone z poli(D,L-laktydo-ko-glikolidu) (D,L-PLGA). W przypadku większości pacjentów musi on być podawany co dwa tygodnie. W przypadku tego produktu leczniczego główne uwalnianie rysperydonu rozpoczyna się w trzecim tygodniu, trwa od czwartego do szóstego tygodnia i kończy się w siódmym tygodniu [13]. Jednakże, ze względu na fakt, że mikrosfery są zawieszane w roztworze wodnym, podawaniu leku może towarzyszyć ból. Co więcej, w przypadku jakichkolwiek powikłań klinicznych mikrosfery nie mogą być usunięte.

Nasze badania zmierzają do opracowania implantacyjnej postaci leku z rysperydonem na bazie poli(L-laktydo-ko-glikolidu) (L-PLGA) oraz D,L-PLGA, stosowanych jako nośniki leku. Głównym celem przeprowadzonych badań dotyczących nowej postaci leku jest otrzymanie produktu leczniczego, który będzie podawany rzadziej, a rysperydon będzie uwalniany szybciej niż w czwartym tygodniu i dłużej niż przez siedem tygodni, w porównaniu do produktu komercyjnego. Jednakże w tej pracy, na bieżącym etapie badań, określono wpływ powierzchni i właściwości strukturalnych matryc polimerowych na początkowe uwalnianie z nich rysperydonu, a także na ryzyko wystąpienia efektu wyrzutu.

Materiały i metody

Matryce o średnicy 10 mm otrzymywano z dwóch kopolimerów o wysokiej masie cząsteczkowej, to znaczy z L-PLGA 85:15 (100 000 Da) oraz D,L-PLGA 85:15 (90 300 Da) metodą wylewania z roztworu (ang. solution casting method). W badaniu, użyto pięć matryc otrzymanych z L-PLGA o średniej masie 60,74 mg \pm 13,60 i pięć matryc z D,L-PLGA o średniej masie równej 71,22 mg \pm 2,47. Kopolimery zsyntezowano w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze metodą polimeryzacji w masie z zastosowaniem Zr(Acac)₄ jako inicjatora polimeryzacji o niskiej toksyczności, według wcześniej opracowanej metodologii [14,15].

Matryce zawierające 10% rysperydonu (Teva Kutno S.A.) inkubowano w buforze PBS (pH 7,4) w stosunku 15 mg matrycy : 1 ml PBS, w warunkach ciągłego wytrząsania (240 obrotów na minutę) w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po tym okresie badano obecność rysperydonu w buforze. Powierzchnię i właściwości strukturalne matryc polimerowych badano przed ich inkubacją w buforze PBS.

Pomiary stężenia rysperydonu wykonano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC z użyciem pieca kolumnowego (L-2450, VWR Hitachi, Merck), detektora UV (L-2355 diode array detektor, VWR Hitachi, Merck) i chromatografu Elite LaChrom (VWR Hitachi, Merck).

Introduction

According to the literature data schizophrenia affects a significant part of the world population, i.e. the range of 0.3-0.7% [1,2]. A lot of neuroleptics in various formulations have found the application in the treatment of schizophrenia [3-6]. One of them was risperidone, clinically used since the late 80's [7,8]. In the last two decades, such formulations containing risperidone as conventional oral tablets and orodispersible tablets, solutions and long-acting injections were proposed to increase the bioavailability of risperidone and to decrease its widely understood side effects [9-12]. Regardless of the point of view, the above-mentioned formulations possess the smaller or larger drawbacks. The biggest drawback of oral formulations seems to be the need of regular daily applications. An alternative to the traditional drug formulations is to use various long-acting injections. The commercially available medical product containing risperidone in the form of a long-acting injection includes the encapsulated microspheres composed of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (D,L-PLGA) and must be applied every two weeks for most patients. In the case of this medical product the main release of risperidone begins in the 3rd week, lasts from the 4th to 6th week and ends in the 7th week [13]. However, due to the fact that the microspheres are suspended in an aqueous solution, the drug's administration may be accompanied by pain. Moreover, in the event of any clinical complications microspheres cannot be removed.

In our studies, an implantable drug formulation with risperidone on the basis of poly(L-lactide-co-glycolide) (L-PLGA) and D,L-PLGA as drug carries will be developed. The main aim of the performed studies on a novel formulation is obtaining a medical product which will be applied less frequently and risperidone will be released faster than in the 4th week and longer than for 7 weeks in comparison with a commercial product. However, in this work, at the current stage of studies, the influence of surface and structural properties on the initial release of risperidone from polymeric matrices and the risk of the burst effect will be determined.

Materials and Methods

The matrices (10 mm diameter) were obtained from two high molecular weight copolymers, i.e. L-PLGA 85:15 (100 000 Da) and D,L-PLGA 85:15 (90 300 Da) by solution casting method. In this study, five matrices obtained from L-PLGA with an average weight equal to 60.74 mg \pm 13.60 and five matrices from D,L-PLGA with an average weight equal to 71.22 mg \pm 2.47 were used. The copolymers were synthesized at the Centre of Polymer and Carbon Materials of Polish Academy of Sciences in Zabrze in bulk with the use of Zr(Acac)₄ as a low toxic initiator according to the previously developed methodology [14,15].

The matrices containing 10% of risperidone (Teva Kutno S.A.) were incubated in a PBS buffer (pH 7.4) in the ratio of 15 mg of matrix : 1 ml of PBS during 24 hours under constant agitation (240 revs per minute) at 37°C. After this period the buffer was examined for the presence of risperidone. Surface and structural properties of polymeric matrices were determined before their incubation in the PBS buffer.

Determination of risperidone concentration was done by high-performance liquid chromatography – HPLC using a column oven (L-2450, VWR Hitachi, Merck), a UV detector (L-2355 diode array detector, VWR Hitachi, Merck) and Elite LaChrom chromatograph (VWR Hitachi, Merck).

Skład i struktura łańcucha stosowanych kopolimerów (średnia długość bloków glikolidowych (l_{GG}) i bloków laktidowych (l_{LL}), współczynnik beładności (R)) określano za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) (1H i ^{13}C). Widma 1H NMR rejestrowano przy częstotliwości 600 MHz, widma ^{13}C NMR rejestrowano przy częstotliwości 125 MHz, za pomocą spektrometru AVANCE II Ultra Shield Plus Bruker 600 MHz z zastosowaniem probówek 5-mm. Jako rozpuszczalnika użyto DMSO- d_6 .

Właściwości termiczne polimerów wyznaczono za pomocą różnicowej kalymetrii skaningowej (DSC) z użyciem aparatu TA DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE). Pomiaru wykonano przy szybkości grzania 20°C/min, w zakresie temperatur od -20°C do 200°C, w atmosferze azotu (przepływ = 50 mL/min). Do kalibracji kalorymetru zastosowano wysokiej czystości ind i gal. Temperatury zeszklenia (T_g) zostały wyznaczone dla próbek amorficznych, stosując szybkość ogrzewania 20°C/min. W celu uzyskania amorficznej próbki, badane materiały były ogrzewane do 220°C, a następnie szybko schłodzone przez umieszczenie ich w ciekłym azocie. Jako temperaturę zeszklenia (T_g) przyjęto temperaturę odpowiadającą punktowi przegięcia na zależności zmiany ciepła właściwego z temperaturą (ang. midpoint).

Badania morfologiczne powierzchni matryc przeprowadzono z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) i mikroskopu sił atomowych (AFM). Do badań użyto SEM Quanta 250 FEG (FEI Company). Przed wykonaniem zdjęć próbki pokrywano warstwą złota o grubości 3 nm przy użyciu napylarki. Zdjęcia rejestrowano w niskiej próżni, przy napięciu przyspieszającym równym 5 kV podczas skanowania. Obrazowanie powierzchni z użyciem AFM przeprowadzono za pomocą MultiMode 3 (di-Veeco, CA) pracującego w trybie kontaktu przerywanego w warunkach atmosferycznych. Wszystkie obrazy AFM przetwarzano za pomocą oprogramowania WSxM (Nanotec Electronica) [16]. Przed pomiarami matryce suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej w łożu laminarnej, a następnie pod zmniejszonym ciśnieniem.

Wyniki i dyskusja

Podczas uwalniania rysperydonu z implantacyjnych biodegradowalnych postaci leku mogą mieć miejsce różne niekorzystne zjawiska. Jednym z nich jest efekt wyrzutu. Jest on szeroko opisany w literaturze dla innych substancji leczniczych i różnych nośników [17, 18]. W tej pracy badane będą nowe postacie mogące uwalniać rysperydon dłużej niż przez 7 tygodni. W tym aspekcie ograniczenie lub całkowita eliminacja efektu wyrzutu ma istotne znaczenie. Z jednej strony niekontrolowane uwalnianie substancji leczniczej może powodować pojawienie się efektu toksycznego in vivo. Z drugiej strony nadmierne uwalnianie substancji leczniczej bezpośrednio wpływa na redukcję jej dawki w matrycach polimerowych.

Niewątpliwie występują zależności pomiędzy początkowym uwalnianiem rysperydonu a topografią i strukturą polimerowej matrycy. Zostało to potwierdzone w niniejszym badaniu. Zaobserwowano istotne różnice między matrycami wykonanymi z L-PLGA i D,L-PLGA w ilości uwolnionego rysperydonu, w obrazach SEM i AFM oraz w danych uzyskanych z widm NMR.

Początkowe uwalnianie rysperydonu było nieznaczne (L-PLGA 30,94 $\mu\text{g} \pm 3,16$, tj. 0,51%; D,L-PLGA 167,07 $\mu\text{g} \pm 19,25$ tj. 2,35%), w związku z tym efekt wyrzutu nie wystąpił w przypadku żadnego z badanych polimerów. Jednakże, odnotowano znaczące różnice w ilości uwolnionego leku pomiędzy kopolimerami.

The composition and chain structure of used copolymers (average length of glycolidyl (l_{GG}) and lactidyl blocks (l_{LL}), randomization ratio (R)) were determined by 1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). 1H NMR data were recorded at 600 MHz and ^{13}C NMR at 125 MHz using AVANCE II Ultra Shield Plus Bruker 600 MHz spectrometer and a 5-mm sample tube. DMSO- d_6 was used as solvent.

Thermal characteristics of polymers were obtained by means of differential scanning calorimetry (DSC), using the TA DSC 2010 apparatus (TA Instruments, New Castle, DE) at a heating rate of 20°C/min, in range from -20°C to 200°C, under the nitrogen atmosphere (flow = 50 mL/min). The instrument was calibrated with high purity indium and gallium. The glass transition temperatures (T_g) were determined for amorphous samples at heating rate of 20°C/min. To obtain amorphous sample the initial materials were first heated to 220°C and then quenched into liquid nitrogen. T_g was taken as the midpoint of the increase of the specific heat associated with the transition.

The morphological study of the matrices' surface was performed by a scanning electron microscope (SEM) and an atomic force microscope (AFM). SEM Quanta 250 FEG (FEI Company) was employed in this study. Prior to observation the samples were sputter coated with a 3 nm layer of gold and investigated at low vacuum. The accelerating voltage was 5 kV while scanning. AFM imaging was performed using MultiMode 3 (di-Veeco, CA) working in the tapping mode under atmospheric conditions. All AFM images were processed using the software package WSxM (Nanotec Electronica) [16]. Before measurements, the matrices were air dried at room temperature in the laminar box and then under reduced pressure.

Results and Discussion

During risperidone release from the implantable biodegradable formulations various unfavorable phenomena may take place. One of them is burst effect, widely described in literature for other drug substances and various drug carriers [17, 18]. In this work, novel formulations which may release risperidone longer than for 7 weeks will be developed. In this aspect, the limitation or elimination of the burst effect is significantly important. On the one hand, uncontrolled release of drug substance may influence toxic effect in vivo. On the other hand, excessive release of drug substance directly affects the dose reduction in the polymeric matrices.

Undoubtedly, risperidone's initial release mainly depends on the topography and structure of polymeric matrices, as confirmed in this study. Significant differences between L-PLGA and D,L-PLGA matrices in the level of risperidone release, SEM and AFM images and NMR data were observed.

The initial release of risperidone was not significant (L-PLGA 30.94 $\mu\text{g} \pm 3.16$, tj. 0.51%; D,L-PLGA 167.07 $\mu\text{g} \pm 19.25$ tj. 2.35%), so the burst effect did not occur in any of the studied polymers. However, significant differences were noted between the released drug amounts of the copolymers. The level of risperidone release during the first 24 hours may give information about the amount of substance which was not incorporated into the matrix. It should be emphasized that during the first 24 hours, hydrolytic degradation does not take place in the case of high molecular mass aliphatic polyesters. In this period mainly surface phenomena may determine the risperidone release. However, surface properties are largely a reflection of structural properties.

Ilość uwolnionej substancji leczniczej podczas pierwszych 24 godzin może dawać informację o ilości substancji, która nie była inkorporowana do wnętrza matrycy. Powinno się podkreślić, iż w przypadku alifatycznych poliestrów o wysokich masach cząsteczkowych hydrolytyczna degradacja nie występuje podczas pierwszych 24 godzin. W tym okresie o uwalnianiu risperidonu mogą decydować głównie zjawiska powierzchniowe. Natomiast właściwości powierzchni są w dużej mierze odzwierciedleniem właściwości strukturalnych.

W badaniach NMR wykazano istotne różnice średniej długości sekwencji laktydylowych i glikolidylowych, jak również współczynnika bezładności R pomiędzy matrycami L-PLGA i D,L-PLGA. Kopolimer L-PLGA charakteryzował się znacząco większą średnią długością bloków (l_{LL} i l_{GG}) niż D,L-PLGA (TABELA 1). Średnia długość bloków l_{LL} i l_{GG} pozwoliła na określenie rodzaju struktury kopolimerów. Biorąc pod uwagę, że struktura blokowa polimerów występuje przy wartości współczynnika bezładności równej 0, semi-blokowa przy wartości współczynnika 0,5, a bezładna przy wartości równej 1, to struktura L-PLGA była bardziej blokowa niż D,L-PLGA (TABELA 1).

Na podstawie średniej długości bloków l_{LL} , l_{GG} oraz współczynnika bezładności R trudno jest jednoznacznie określić jak struktura matrycy wpływała na początkowe uwalnianie risperidonu z matryc L-PLGA i D,L-PLGA. Zatem na podstawie badań NMR nie wiadomo dlaczego początkowe uwalnianie risperidonu z matryc L-PLGA było na znacząco niższym poziomie. Więcej wyjaśnień można uzyskać z analizy właściwości powierzchniowych.

Obrazy SEM i AFM odzwierciedlały znaczące różnice w morfologii analizowanych powierzchni pomiędzy matrycami L-PLGA i D,L-PLGA. W przypadku L-PLGA, zdjęcia SEM pokazały silną porowatość matrycy. Pory były jednolicie rozmieszczone, posiadały owalny kształt (RYS. 1a). Analiza AFM matryc ujawniła liczne wzniesienia i zagłębienia na powierzchni, które mogły być związane z obecnością porów (RYS. 1b). Według naszej opinii porowatość może wpływać na uwalnianie początkowe na różne sposoby. Może być to potwierdzone tylko w sposób eksperymentalny. Pory zlokalizowane wewnątrz matrycy mogą być odpowiedzialne za pułapowanie leku i wpływać na jego uwalnianie w większej ilości na późniejszym etapie degradacji. Jednak pory zlokalizowane na powierzchni, które nie zawierają leku lub zawierają jego niewielkie ilości, mogą powodować nieistotne uwalnianie risperidonu na początkowym etapie degradacji. To zjawisko mogło mieć miejsce w przypadku badanych matryc L-PLGA, które wykazały uwalnianie risperidonu na poziomie 0,51% jego całkowitej zawartości podczas pierwszych 24 godzin.

Zaobserwowana porowata powierzchnia powstała podczas otrzymywania matryc i może wynikać ze składu kopolimeru. Działanie rozpuszczalnika podczas procesu otrzymywania matryc mogło również spowodować różnice między powierzchniami polimerów o różnej strukturze. Istnieją doniesienia o zmianach konformacyjnych i morfologicznych na powierzchni L-PLGA i D,L-PLGA indukowanych rozpuszczalnikiem. Wykazano również wzrost kąta zwilżania po zastosowaniu rozpuszczalnika, co świadczy o jego ogromnym wpływie na właściwości powierzchni polimerów. Wzrost wartości kąta zwilżania jest także powiązany z rozmieszczeniem hydrofobowych grup metylowych na powierzchni polimeru. Wykazano również, że T_g ma duży wpływ na rozmieszczenie grup metylowych na powierzchni – polimer o niższej wartości T_g wykazał wyższy stopień zmian powierzchni w porównaniu z polimerami o wyższej wartości T_g [19]. Różnice morfologii powierzchni mogły być zatem spowodowane różnicami T_g pomiędzy L-PLGA i D,L-PLGA, które różnią się właściwościami termicznymi [19].

TABELA 1. Struktura polimerów L-PLGA i D,L-PLGA przed inkubacją w buforze PBS określona na podstawie badań NMR. Zawartość segmentów laktydylowych (F_{LL}) i glikolidylowych (F_{GG}); średnia długość bloków laktydylowych (l_{LL}) i glikolidylowych (l_{GG}); R – współczynnik bezładności.

TABLE 1. Structure of L-PLGA and D,L-PLGA determined by NMR study before incubation in the PBS buffer. Content of lactidyl (F_{LL}) and glycolidyl (F_{GG}) segment; the average length of lactidyl (l_{LL}) and glycolidyl (l_{GG}) blocks; R – randomization ratio.

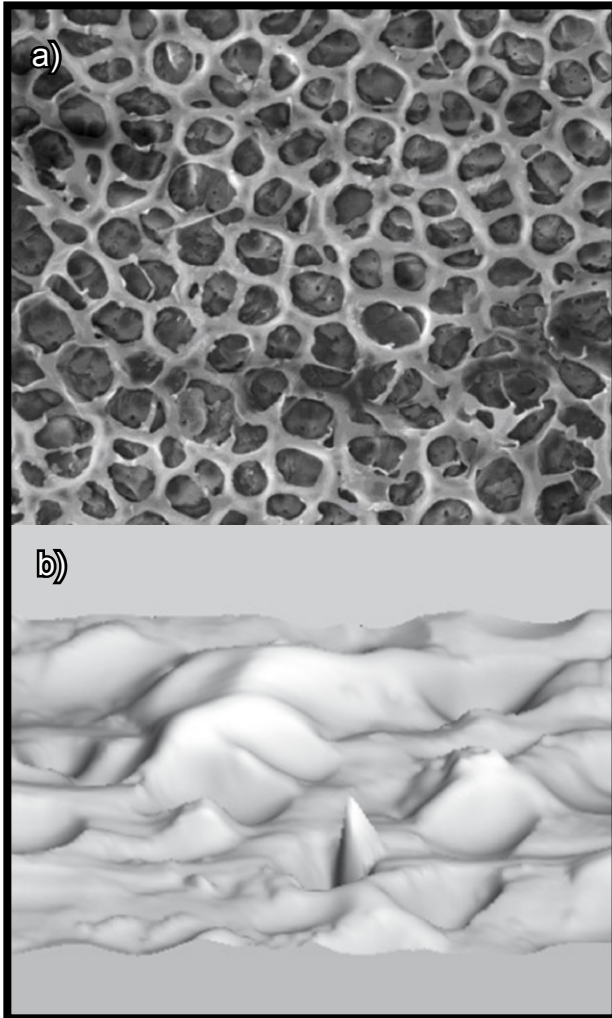
Copolymers Kopolimery	F_{LL} [%]	F_{GG} [%]	l_{LL}	l_{GG}	R
L-PLGA	85	15	11.34	2.08	0.33
D,L-PLGA	85	15	8.8	1.6	0.43

In the NMR study, significant differences were shown between the l_{LL} , l_{GG} and R values of L-PLGA and D,L-PLGA matrices. The L-PLGA copolymer revealed significantly longer l_{LL} and l_{GG} than D,L-PLGA (TABLE 1). The l_{LL} and l_{GG} allowed determining the copolymers' structure. Considering that the block structure of polymers occurs at the value of randomization ratio equal to 0, the semi-block structure at the value of 0.5 and the random structure at the value of 1, the structure of L-PLGA was more blocky than that of D,L-PLGA (TABLE 1).

On the basis of l_{LL} , l_{GG} and R values it is difficult to clearly explain how the matrix structure influenced the initial release of risperidone from L-PLGA and D,L-PLGA matrices. Therefore, it is not known on the basis of the NMR study why the initial release of risperidone from the L-PLGA matrix was noted on a significantly lower level. More explanations may be obtained from the analysis of surface properties.

SEM and AFM images reflected significant differences in the morphology of the analyzed surface between the L-PLGA and D,L-PLGA matrices. In the case of L-PLGA, the SEM image showed strong porosity of the matrix. The pores were uniformly distributed with an oval shape (FIG. 1a). The AFM analysis of the matrix revealed numerous hills and hollows on the surface, which might be related to the presence of the pores (FIG. 1b). In our opinion, generally porosity may influence the initial release in various ways. It may be confirmed only in an experimental way. Pores located inside the matrix may be responsible for entrapping drugs and influence the release of drugs in higher amount at the later stage of degradation. However, the pores located at the surface which do not contain drug or contain little amount of drug may cause insignificant risperidone release at the initial stage of degradation. This phenomenon might take place in the case of the studied L-PLGA matrices which revealed 0.51% release of risperidone during the first 24 hours.

The observed porous surface was formed during the preparation of matrices. It seems that it is a result of copolymer composition. The effect of solvent addition during processing might also result in differences between the surface morphology of polymers with various structures. In another study, differences in solvent induced conformational and morphological changes at the surface of L-PLGA and D,L-PLA were determined. It showed that the contact angle increases after solvent treatment, so the solvent has tremendous effect onto the surface characteristics of polymers. The increase in water contact angle is also related to the segregation of the methyl hydrophobic groups at the polymer surface. It was reported that T_g has a great influence onto the surface segregation of methyl groups – polymer with lower T_g value showed higher surface restructuring extent in comparison with polymers with higher T_g value [19].

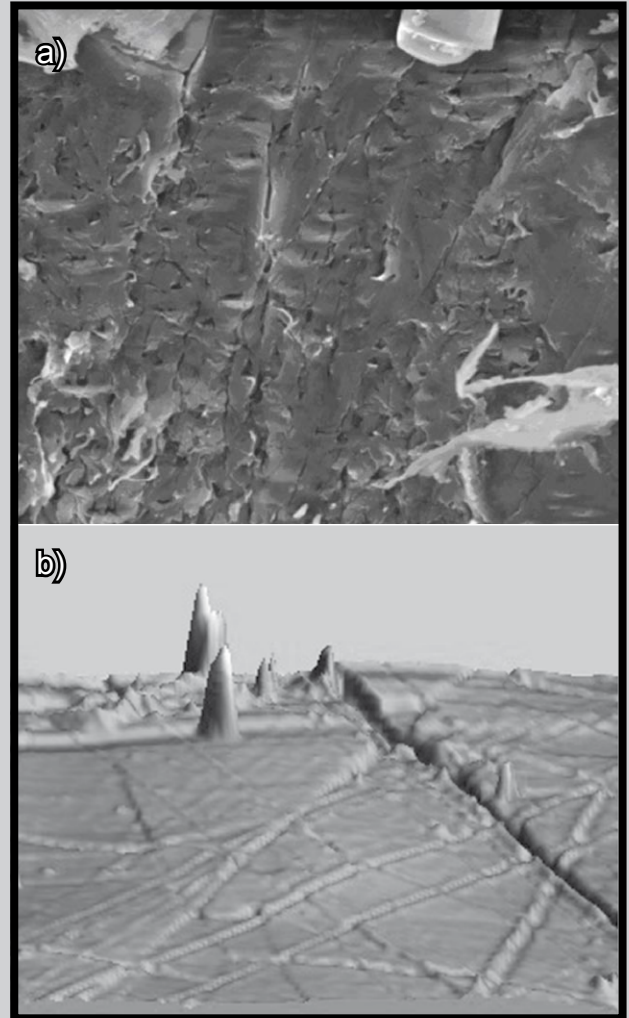


RYS. 1. Morfologia matrycy L-PLGA zawierającej rysperydon przed inkubacją w buforze PBS: obraz SEM (powiększenie x 9356) (a), obraz AFM height 3D (14,5 μm x 14,5 μm x 1,13 μm) (b).

FIG. 1. Morphology of the L-PLGA matrix containing risperidone before incubation in the PBS buffer: SEM image (magnification x 9356) (a), AFM height 3D image (14.5 μm x 14.5 μm x 1.13 μm) (b).

W rzeczywistości, różnica w T_g badanych polimerów była niewielka (T_g of L-PLGA $\approx 57^\circ\text{C}$ and T_g of D,L-PLGA $\approx 53^\circ\text{C}$), więc prawdopodobnie także inne czynniki, na przykład różnice w amorficzności kopolimeru czy w budowie łańcucha miały wpływ na różnice w morfologii powierzchni.

W przypadku matrycy pozbawionych porów, tj. D,L-PLGA (RYS. 2), uwalnianie rysperydonu było prawie pięć razy większe. Obrazy SEM (RYS. 2a) i AFM (RYS. 2b) matrycy D,L-PLGA pokazały również litą powierzchnię złożoną z morfologicznych elementów o różnych rozmiarach. D,L-PLGA jest materiałem bardziej amorficznym ze względu na ataktyczną strukturę segmentów polilaktydowych. Łańcuchy kopolimeru były rozmieszczone nieregularnie, co mogło mieć wpływ na utworzenie litej powierzchni. Tym samym powierzchnia wzajemnego oddziaływania oraz sił adhezji pomiędzy cząsteczkami rysperydonu i D,L-PLGA mogły być mniejsze. Przyпускаjemy, że większe uwalnianie rysperydonu jest blisko związane z tą cechą. Co więcej, zwiększona ruchliwość łańcuchów polimerowych, która charakteryzuje polimery amorficzne, może sprzyjać łatwiejszemu uwalnianiu leku z zewnętrznym obszarom matrycy.



RYS. 2. Morfologia matrycy D,L-PLGA zawierających rysperydon przed inkubacją w buforze PBS: zdjęcie SEM (powiększenie x 9402) (a), obraz AFM height 3D (10 μm x 10 μm x 1,13 μm) (b).

FIG. 2. Morphology of the D,L-PLGA matrix containing risperidone before incubation in the PBS buffer: SEM image (magnification x 9402) (a), AFM height 3D image (10 μm x 10 μm x 1.13 μm) (b).

Thereafter there might be the differences in surface morphology between L-PLGA and D,L-PLGA, which differ in thermal properties. In fact, the difference of the T_g values of the studied copolymers was very small (T_g of L-PLGA $\approx 57^\circ\text{C}$ and T_g of D,L-PLGA $\approx 53^\circ\text{C}$), so probably also other factors e.g. difference in copolymer amorphicity, copolymer chain structure had an impact on the various surface morphology.

The matrices deprived of pores, i.e. D,L-PLGA (FIG. 2), revealed the release of risperidone which was almost five times larger. The SEM (FIG. 2a) and AFM (FIG. 2b) images of the D,L-PLGA matrix showed also a solid surface composed of morphologic elements with various sizes. D,L-PLGA is an amorphous material as a result of the atactic structure of the polylactide segments. Copolymer chains were distributed irregularly which might have influence on the surface morphology. Ipso facto the surface of interaction and the adhesion forces between the molecules of risperidone and D,L-PLGA might be lower. We suppose that the higher release of risperidone is closely associated with this feature. Moreover, the increased chain mobility which characterizes amorphous polymers may favor easier drug release from the outer part of the matrix.

Wnioski

Podsumowując, żaden z badanych polimerów nie ujawnił efektu wyrzutu, chociaż w przypadku L-PLGA odnotowano mniejszą ilość uwolnionego leku podczas pierwszych 24 godzin niż w przypadku D,L-PLGA. Jednakże, D,L-PLGA jest bardziej amorficzny niż L-PLGA, zatem będzie degradował szybciej, co może spowodować większe uwalnianie rysperydonu w krótszym okresie. Z kolei bardziej krystaliczny L-PLGA może wpływać na dłuższe i mniej regularne uwalnianie rysperydonu. Właściwym i najprostszym sposobem uniknięcia efektu wyrzutu w przypadku produktu leczniczego wydaje się przemywanie implantu podczas jego przygotowywania. Jednak może to wpłynąć na zmniejszenie dawki rysperydonu. Wydaje się, że istnieje silna korelacja między właściwościami powierzchniowymi i strukturalnymi, a poziomem uwalnianego leku. 10% zawartość rysperydonu w matrycy D,L-PLGA mogła być zbyt duża z punktu widzenia większej ilości uwalnianego leku. Jest możliwe, że mniejsza dawka (np. 5% lub 7,5%) może być bardziej optymalna dla tego kopolimeru. Wówczas siły adhezji pomiędzy cząsteczkami rysperydonu i D,L-PLGA mogą być wystarczające dla obniżenia uwalniania leku w fazie inicjalnej. Dużo mniejsza ilość leku została uwolniona z L-PLGA, co znalazło odzwierciedlenie w odmiennej morfologii powierzchni, czyli obecności porów. Jak wspomniano wcześniej, pory zlokalizowane wewnątrz matrycy mogą być odpowiedzialne za pułapkowanie leku i wpływać na jego uwalnianie w większej ilości w późniejszych stadiach degradacji. Jednakże pory zlokalizowane na powierzchni, które nie zawierają leku lub zawierają jedynie niewielkie jego ilości, mogą powodować niezależne uwalnianie rysperydonu na początkowym etapie degradacji. Niewątpliwie potrzebne są dalsze badania, aby scharakteryzować cały profil uwalniania leku, jednak już otrzymane rezultaty ujawniają brak efektu wyrzutu w przypadku obu badanych polimerów. W związku z tym oba materiały wykazują potencjał dla opracowania implantacyjnych systemów terapeutycznych zawierających rysperydon. Co więcej, wykazywały one zróżnicowanie szybkości uwalniania leku w ciągu pierwszych 24 godzin, co daje możliwość wybrania optymalnego polimeru dla danej terapii i pożądanej dawki inicjacyjnej.

Podziękowania

Praca sfinansowana z grantu nr KNW-1-023/P/2/0 Śląskiego Uniwersytetu Medycznego.

Autorzy składają podziękowania firmie Teva Kutno S.A. za udostępnienie substancji leczniczej (rysperydon).

Conclusions

Concluding, none of the studied polymers exhibited the burst release, however in the case of L-PLGA lower amount of drug released during first 24 hours was noted than in the case of D,L-PLGA. However, D,L-PLGA is more amorphous than L-PLGA. D,L-PLGA will degrade faster, which may influence bigger release of risperidone in a shorter period. In turn, more crystalline L-PLGA may influence longer and less even release of risperidone. A proper and the simplest way to avoid the burst effect in the case of a medical product seems to be washing the implant during its preparation. However, this will affect the decrease in risperidone dose. It seems that there is a strong correlation of the surface and structural properties with the level of the released drug. A 10% content of risperidone in the D,L-PLGA matrix might be too high from the point of view of the higher amount of released drug. It is possible that a lower dose (e.g. 5% or 7.5%) will be more optimal for this copolymer. Then, adhesion forces between the molecules of risperidone and D,L-PLGA may be sufficient for the lowering of released drug in the initial phase. Much lower amount of drug was released from L-PLGA, which found a reflection in different surface morphology, i.e. the presence of pores. As was mentioned before, pores located inside the matrix may be responsible for entrapping drugs and influence the release of drugs in higher amount in the later stage of degradation. However, the pores located on the surface which do not contain drug or contain little amount of drug might cause insignificant risperidone release in the initial stage of degradation. Undoubtedly, further study is necessary to determine the whole drug release profile; however the obtained results showed the lack of burst effect for both of the studied polymers, so they exhibited potential in developing implantable delivery system of risperidone. Moreover, they showed different drug release in the first 24 hours, which gives the possibility to choose the optimal polymer for the treatment and demanded initial dose.

Acknowledgments

This work was financially supported by Medical University of Silesia, grant no KNW-1-023/P/2/0.

The authors thank Teva Kutno S.A. for providing the drug substance, i.e. risperidone.

- [1] http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/
- [2] McGrath J., Saha S., Chant D., Welham J.: Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 30 (2008) 67-76.
- [3] Asenjo Lobos C., Komossa K., Rummel-Kluge C., Hunger H., Schmid F., Schwarz S., Leucht S.: Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* 11 (2010) CD006633.
- [4] Leucht C., Heres S., Kane J.M., Kissling W., Davis J.M., Leucht S.: Oral versus depot antipsychotic drugs for schizophrenia. A critical systematic review and meta-analysis of randomised long-term trials. *Schizophr Res* 127 (2011) 83-92.
- [5] Leucht S., Tardy M., Komossa K., Heres S., Kissling W., Davis J.M.: Maintenance treatment with antipsychotic drugs for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* 5 (2012) CD008016.
- [6] Miyamoto S., Miyake N., Jarskog L.F., Fleischhacker W.W., Lieberman J.A.: Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Mol Psychiatr* 10 (2012) 1038/mp.2012.47.
- [7] Roose K., Gelders Y., Heylen S.: Risperidone (R64 766) in psychotic patients. A first clinical therapeutic exploration. *Acta Psychiatr Belg* 88 (1988) 233-241.
- [8] Castelão J.F., Ferreira L., Gelders Y.G., Heylen S.L.: The efficacy of the D2 and 5-HT2 antagonist risperidone (R 64,766) in the treatment of chronic psychosis. An open dose-finding study. *Schizophr Res* 2 (1989) 411-415.
- [9] Gutierrez R., Lee P.I., Huang M.L., Woestenborghs R.: Risperidone: effects of formulations on oral bioavailability. *Pharmacotherapy* 17(1997) 599-605.
- [10] Kane J.M., Eerdekens M., Lindenmayer J.P., Keith S.J., Lesem M., Karcher K.: Long-acting injectable risperidone: efficacy and safety of the first long-acting atypical antipsychotic. *Am J Psychiatr* 160 (2003) 1125-1132.

- [11] Tassaneeyakul W., Kumar S., Gaysonsiri D., Kaewkamson T., Khuroo A., Tangsucharit P., Phunikhom K., Vannaprasaht S., Kanjanawart S., Rao Thudi N., Jain R., Reyar S., Monif T.: Comparative bioavailability of two risperidone orodispersible tablet products after single dose administration. *Int J Clin Pharm Th* 48 (2010) 614-620.
- [12] Huang M., Shen-Tu J., Hu X., Chen J., Liu J., Wu L.: Comparative fasting bioavailability of dispersible and conventional tablets of risperidone: a single-dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover study in healthy male chinese volunteers. *Clin Ther* 34 (2012) 1432-1439.
- [13] http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/Referrals_document/Risperdal_Consta_30/WC5000_08170.pdf.
- [14] Dobrzyński P., Bero M., Kasperczyk J.: Sposób wytwarzania bioresorbowalnych polimerów. Opis patentowy PL 191846 B1 (2000).
- [15] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Bero M.: Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1: Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by Zr(Acac)₄. *Macromolecules* 34 (2001) 5090-5098.
- [16] Horcas I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J.M., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baro A.M. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum* 78 (2007) 013705.
- [17] Trindade R.A., Kiyohara P.K., de Araujo P.S., Bueno da Costa M.H.: PLGA microspheres containing bee venom proteins for preventive immunotherapy. *Int J Pharm* 423 (2012) 124-133.
- [18] Rafati A., Boussahel A., Shakesheff K.M., Shard A.G., Roberts C.J., Chen X., Scurr D.J., Rigby-Singleton S., Whiteside P., Alexander M.R., Davies M.C.: Chemical and spatial analysis of protein loaded PLGA microspheres for drug delivery applications. *J Control Release* (2012) [Epub ahead of print].
- [19] Thanki P.N., Dellacherie E., Six J.L.: Surface characteristics of PLA and PLGA films. *Appl Surf Sci* 253 (2006) 2758-2764.

OTRZYMYWANIE NOWYCH, WYSOKOELASTYCZNYCH I BIORESORBOWALNYCH KOPOLIMERÓW WĘGLANÓW ALIFATYCZNYCH

MAŁGORZATA PASTUSIAK^{1*}, PIOTR DOBRZYŃSKI^{1,2},
JANUSZ KASPERCZYK^{1,3}, ANNA SMOLA¹, MICHAŁ SOBOTA¹

¹ CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH PAN
UL. SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE

² INSTYTUT CHEMII, OCHRONY ŚRODOWISKA I BIOTECHNOLOGII,
AKADEMIA IM. JANA DŁUGOSZA,
AL. ARMII KRAJOWEJ 13/15, 42-201 CZĘSTOCHOWA

³ ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,
KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC

*E-MAIL: MPASTUSIAK@CMPW-PAN.EDU.PL

Streszczenie

Szereg bioresorbowalnych, liniowych kopolimerów węglanu 1,3-trimetyleny (TMC) z węglanem 2,2-dimetylotrimetyleny (DTC) syntezowano poprzez polimeryzację z otwarciem pierścienia (ROP) prowadzoną w stopie. Kopolimery otrzymano w obecności jednowodnego acetyloacetonianu cynku (II), jako inicjatora. Związek ten, o niskiej toksyczności okazał się bardzo efektywnym inicjatorem przedstawionych reakcji. Otrzymane kopolimery scharakteryzowane zostały metodami spektroskopii ¹H and ¹³C NMR, a także metodą DSC, TGA i GPC. Zbadano wpływ składu komonomerów na termiczne i mechaniczne właściwości otrzymanych kopolimerów. Następnie wytypowano najlepszy materiał spośród syntezowanych kopolimerów, z którego uformowano elastyczne, porowate podłoże do hodowli komórek.

Słowa kluczowe: polimery bioresorbowalne, kopolimeryzacja, cykliczne węglany, węglan trimetyleny, węglan 2,2-dimetylotrimetyleny

[Inżynieria Biomateriałów 118 (2013) 37-42]

Wprowadzenie

Bioresorbowalne kopolimery zawierające w swoim składzie jednostki węglanowe pochodzące od węglanu trimetyleny, charakteryzują się wysoką elastycznością. To sprawia, że są one bardzo obiecującymi materiałami do zastosowań biomedycznych zwłaszcza w technikach inżynierii tkankowej do formowania nośników komórek mięśniowych (mięsień sercowy) czy elastycznych implantów w neurochirurgii i chirurgii miękkiej. Szczególnie interesujące właściwości termiczne i mechaniczne prezentują kopolimery dwóch sześcioczłonowych węglanów: węglanu trimetyleny z węglanem 2,2-dimetylotrimetyleny. Węglany te pomimo podobnej struktury posiadają jednak wyraźnie odmienne właściwości termiczne. Poliwęglan trimetyleny (PTMC) jest polimerem amorficznym o temperaturze zeszczenia $T_g = -17^\circ\text{C}$, natomiast poliwęglan 2,2-dimetylotrimetyleny (PDTC) jest polimerem semikrystalicznym [1-3].

Dotychczas, kopolimery tych monomerów otrzymywane były w obecności kompleksów ziem rzadkich, charakteryzowały się stosunkowo niskim stopniem krystaliczności i niską masą molową [4,5].

THE OBTAINING OF NEW HIGH ELASTIC BIORESORBABLE ALIPHATIC CARBONATE COPOLYMERS

MAŁGORZATA PASTUSIAK^{1*}, PIOTR DOBRZYŃSKI^{1,2},
JANUSZ KASPERCZYK^{1,3}, ANNA SMOLA¹, MICHAŁ SOBOTA¹

¹ CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
34 SKŁODOWSKA-CURIE STREET, 41-800 ZABRZE, POLAND

² INSTITUTE OF CHEMISTRY, ENVIRONMENTAL PROTECTION AND
BIOTECHNOLOGY, JAN DŁUGOSZ UNIVERSITY IN CZĘSTOCHOWA,
13 ARMII KRAJOWEJ STR., 42-218 CZĘSTOCHOWA, POLAND

³ DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, SCHOOL OF PHARMACY,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
1 NARCYZOW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

* E-MAIL: MPASTUSIAK@CMPW-PAN.EDU.PL

Abstract

A series of bioresorbable, linear copolymers of 1,3-trimethylene carbonate (TMC) and 2,2-dimethyltrimethylene carbonate (DTC) were synthesized by bulk ring-opening polymerization (ROP). Copolymers were prepared in the presence of zinc acetylacetonate monohydrate (II) as initiator. This low toxic compound occurred to be a very effective initiator of presented reactions. The resulting copolymers were characterized by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, DSC, TGA and GPC measurements. The influence of the monomer composition on the thermal and mechanical properties of the obtained copolymers was investigated. Afterwards, from synthesized copolymers the best material was selected for manufacturing highly flexible, porous scaffolds for cell culture.

Keywords: bioresorbable polymers, copolymerization, cyclic carbonates, 1,3-trimethylene carbonate, 2,2-dimethyltrimethylene carbonate

[Engineering of Biomaterials 118 (2013) 37-42]

Introduction

Bioresorbable copolymers, containing carbonate units, derived from trimethylene carbonate monomer present high flexibility and low glass transition temperature. This makes them very promising materials for biomedical applications, especially for scaffold for muscle cells (heart muscle) in tissue engineering techniques or flexible implant in neurosurgery and soft surgery formation. Especially, copolymers with two six-membered carbonates, such as trimethylene carbonate and 2,2-dimethyltrimethylene carbonate, showed interesting thermal and mechanical properties. However, these carbonate copolymers despite the similar structure to poly(trimethylene carbonate), clearly showed different thermal and morphological properties. PTMC is an amorphous polymer with glass transition temperature $T_g = -17^\circ\text{C}$, while PDTC is a semicrystalline polymer with higher mechanical strength [1-3].

Up to now copolymers of these monomers were obtained with rare earth complexes as an initiator but they characterized by the relatively low degree of crystallinity and low molar mass [4,5].

W obecnej publikacji opisaliśmy badania prowadzone nad kopolimeryzacją sześcioczłonowych, cyklicznych węglanów z zastosowaniem jednowodnego acetyloacetonianu cynku (II), jako inicjatora. Inicjator ten jest związkiem prostym w budowie, stabilnym i stosunkowo niedrogim, a przede wszystkim niskotoksycznym.

Materiały i metody

Monomery i inicjatory

Stosowany cykliczny monomer: węglan trimetyleny (TMC) jest komercyjnym produktem firmy Boehringer (Ingelheim, Niemcy), który przed zastosowaniem oczyszczany był poprzez rekrytalizację z suchego octanu etylu. Drugi monomer: węglan 2,2-dimetylotrimetyleny (DTC), syntezowano poprzez transestryfikację glikolu neopentylu (Aldrich) z węglanem difenylu (Aldrich), a następnie w wyniku termicznej degradacji otrzymywano oligowęglan. Jako inicjator reakcji transestryfikacji stosowano butanolan tytanu (IV) (Aldrich). Po odrzuceniu pierwszej frakcji, otrzymany produkt przemywano dwukrotnie na lejku Buchnera schłodzonym, suchym eterem tert-butylo metylowym (Aldrich). Następnie otrzymany monomer DTC rekrytalizowano z osuszonego toluenu. Uzyskano produkt z 30% wydajnością [6]. Acetyloacetonian cynku jednowodny (II) firmy Alfa Aesar, stosowano bez dodatkowego oczyszczania.

Przebieg kopolimeryzacji

Monomer(y) z odpowiednią ilością inicjatora w atmosferze argonu umieszczano w suchych, szklanych ampulach, które szczelnie zamykano. Ampuły ogrzewano następnie w łaźni olejowej, w temperaturze 130°C, wstrząsając okresowo ich zawartość. Po określonym czasie reakcji ampuły chłodzono do temperatury pokojowej. Otrzymane polimery i kopolimery oczyszczano z resztek monomerów poprzez rozpuszczenie w chloroformie i wkraplanie tak otrzymanego roztworu do chłodnego metanolu. Następnie, oczyszczony materiał, po osuszeniu w suszarce próżniowej w temperaturze pokojowej, poddawano dalszym badaniom.

Formowanie skafoldu

Porowate podłoża otrzymano metodą odlewania z roztworu/ wypłukiwania soli [7,8]. Jako czynnik porotwórczy zastosowano przesiane ziarna chlorku sodu (POCH, Gliwice) o wielkości: 100-300 µm. Porogen mieszano z 20% roztworem kopolimeru w chlorku metylenu (POCH, Gliwice) w takiej proporcji, aby uzyskać udział objętościowy soli równy 80%. Mieszaninę przeniesiono na szklaną szalkę Petriego, suszono w atmosferze powietrza, a następnie w suszarce próżniowej. Na koniec sól wypłukano za pomocą wody destylowanej, a otrzymane porowate podłoża suszono do stałej masy w suszarce próżniowej.

Techniki pomiarowe

Liczbowo i wagowo średnie masy molowe (odpowiednio M_n i M_w) oraz dyspersję (M_w/M_n) otrzymanych polimerów i kopolimerów oznaczono za pomocą chromatografu żelowego Viscotek RImax. Jako fazę ruchomą stosowano chloroform o szybkości przepływu 1 ml/min. Próbkę oznaczano w temperaturze 35°C. Jako detektor stosowano refraktometr różnicowy firmy Viscotek model 3580, a rozdział prezentowano na kolumnach Mixed E.

Liczbowo średnie masy cząsteczkowe badanych polimerów wyznaczono w oparciu o kalibrację wykonaną dla standardów polistyrenowych.

Właściwości termiczne oznaczono metodą różnicowej kalometrii skaningowej (DSC), stosując aparat Du Pont 1090B kalibrowany galem i indem (szybkość ogrzewania i chłodzenia 20°C/min w zakresie od -100°C do 220°C).

In presented paper, we described the investigations on copolymerization of six-membered cyclic carbonates using the zinc acetylacetonate monohydrate (II) as an initiator. This initiator has a simple structure, is a stable, relatively inexpensive, and above all low toxic.

Materials and Methods

Monomers and initiators

The used cyclic monomer: 1,3-trimethylene carbonate (TMC) was obtained from Boehringer (Ingelheim, Germany). It was purified by recrystallization from dried ethyl acetate and then dried in a vacuum oven at room temperature. The second monomer: 2,2-dimethyltrimethylene carbonate (DTC) was synthesized by transesterification of neopentyl glycol (Aldrich) with diphenyl carbonate (Aldrich), and as a result of thermal degradation was obtained oligocarbonate. As initiator of the transesterification reaction was used titanium (IV) butoxide (Aldrich). Having rejected the first fraction, the obtained product was washed twice in cold and dry *tert*-butyl methyl ether (Aldrich). The obtained DTC was recrystallized from dry ethyl acetate. DTC with the yield of 30% was achieved. Zinc (II) acetylacetonate monohydrate (Alfa Aesar) was used as received.

Polymerization and copolymerization procedure

Monomer(s) with the appropriate amount of initiator were charged in argon atmosphere into dried glass ampoules, which then were sealed. The ampoules were conditioned in an oil bath equipped with a periodically working shaker at 130°C. After the selected reaction time, the ampoules were quickly quenched to room temperature. The resulting polymers and copolymers were purified from residual monomer by dissolving in chloroform and dropwise addition of the resulting solution to cold methanol. Then, the purified material, after drying in a vacuum oven at room temperature, was subjected to further studies.

Preparation of scaffolds

The porous scaffolds were produced by solvent casting/salt particulate leaching technique [7,8]. As porogen were used sieved crystals of sodium chloride (POCH, Gliwice) of 100-300 µm. The porogen was mixed with 20% (w/v) copolymer solution in methylene chloride (POCH, Gliwice) in such proportion to receive a salt volume fraction of 80%. The mixture was cast on glass Petri dishes, dried overnight in air, followed in a vacuum oven. At the end, the salt was leached in demineralized water and finally obtained porous scaffold was dried to constant weight in a vacuum oven.

Measurements

The number-average and weight-average molar masses (M_n and M_w , respectively) and dispersity indexes (M_w/M_n) of the polymers and copolymers were determined by gel permeation chromatography with a Viscotek RImax chromatograph. Chloroform was used as the eluent, and the temperature and the flow rate were 35°C and 1 mL/min, respectively. Two PL Mixed E columns with a Viscotek model 3580 refractive index detector were used. The molecular weights were calibrated with polystyrene standards.

Thermal properties, such as glass transition temperatures and heats of melting, were examined by DSC with a DuPont 1090B apparatus calibrated with gallium and indium (heating and cooling rate of 20°C/min in the range from -100°C to 220°C).

Thermal stability of copolymers were examined by TGA with the TGA/DSC 1 METTLER TOLEDO apparatus, at a heating rate of 10°C/min under anaerobic conditions in a nitrogen atmosphere.

Rozkład termiczny kopolimerów TMC/DTC badano stosując aparat TGA/DSC 1 METTLER TOLEDO, pomiar wykonywano z szybkością grzania $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, w warunkach beztlenowych w atmosferze azotu.

Mikrostrukturę skafoldu zbadano za pomocą mikroskopu optycznego (STEMI DV4, Zeiss, powiększenie $20\times$ i $80\times$). Porowatość skafoldu została wyznaczona na podstawie pomiaru jego masy po wysuszeniu oraz masy nasączonego wodą. Porowatość została obliczona według wzoru:

$P(\%) = (1 - \rho_a/\rho_c) \times 100\%$, gdzie ρ_a jest to gęstość skafoldu, a ρ_c jest to gęstość samego kopolimeru ($1,30 \text{ g}/\text{cm}^3$). Wartość ρ_a została określona przy pomocy równania:

$\rho_a = m_{\text{dry}}/[m_{\text{dry}}/\rho_c + (m_{\text{wet}} - m_{\text{dry}})/\rho_w]$, gdzie; ρ_w - gęstość wody w temperaturze 20°C ($0,998 \text{ g}/\text{cm}^3$), m_{dry} - masa skafoldu po wysuszeniu, m_{wet} - masa skafoldu nasączonego wodą.

Badania mechaniczne wytrzymałości na rozciąganie kopolimerów w formie wyprasek (formowanych przy użyciu prasy hydraulicznej) przeprowadzono na maszynie wytrzymałościowej typu „Instron” model 2402. Badania wytrzymałości na rozciąganie prowadzono w temperaturze 23°C , przy szybkości rozciągania $20 \text{ mm}/\text{min}$ i rozstawie szczęk 30 mm . Badania mechaniczne wytrzymałości na ściskanie skafoldu przeprowadzono na maszynie wytrzymałościowej typu „Instron” model 1195. Badania prowadzono w temperaturze 23°C , z szybkością odkształcania $2 \text{ mm}/\text{min}$.

Konwersję reakcji, skład oraz mikrostrukturę otrzymanych kopolimerów wyznaczono przy pomocy spektroskopii protonowego (^1H NMR) i węglowego (^{13}C NMR) rezonansu magnetycznego. Pomiary wykonywano na spektrometrze firmy Bruker AvanceTM 600 MHz stosując, jako rozpuszczalnik, deuterowany chloroform (CDCl_3) oraz tetrametylosilan (TMS) jako standard wewnętrzny. Widma ^1H NMR otrzymano po 64 przejściach, z czasem akwizycji $2,65 \text{ s}$ i długością pulsu $11 \mu\text{s}$. Widma ^{13}C NMR kopolimerów otrzymano po 19500 przejściach, z czasem akwizycji $0,91 \text{ s}$ oraz długością pulsu $9,1 \mu\text{s}$. Przyporządkowanie linii rezonansowych na widmie ^{13}C NMR odpowiednim sekwencjom komonomerów pozwoliło na wyznaczenie średnich długości mikrobloków węglanowych.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań dotyczące polimeryzacji węglanu trimetyleny (TMC), węglanu 2,2-dimetylotrimetyleny (DTC) oraz ich wzajemnej kopolimeryzacji, w obecności jednowodnego acetyloacetonianu cynku (II) - $\text{Zn}(\text{acac})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, zostały przedstawione w TABELI 1. Wszystkie reakcje prowadzone były w stopie, przy stosunku molowym inicjator/monomer równym $1:800$, w temperaturze 130°C . Temperatura reakcji była nieco wyższa od temperatury topnienia monomeru DTC i pozwalała na uzyskanie jednorodnej mieszaniny reakcyjnej.

W obecności $\text{Zn}(\text{acac})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ polimeryzacja TMC zachodziła z dużą wydajnością i nadszpejowaną szybkością oraz pozwalała na otrzymanie poliwęglanu trimetyleny o wysokiej masie molowej [6]. Wyraźnie wolniej przebiegała jednak homopolimeryzacja DTC, a masy molowe M_n otrzymanych węglanów 2,2-dimetylotrimetyleny były ponad dwukrotnie niższe od teoretycznie wyliczonej masy molowej. Różnice te nie były spowodowane jednak reakcją typu „back-biting”, gdyż na żadnym etapie polimeryzacji nie obserwowano istotnego wzrostu dyspersji M_w/M_n , a wzrost masy molowej z postępowaniem reakcji był wprost proporcjonalny [6].

The microstructure of scaffolds was studied using an optical microscope (Stemi DV4, Zeiss, magnification $20\times$ and $80\times$). The porosity of the scaffold was calculated from the weight of the dry and water-soaked scaffolds samples. The percent porosity was calculated using formula:

$P(\%) = (1 - \rho_a/\rho_c) \times 100\%$, where; ρ_a is the apparent density of the scaffold and ρ_c is the density of the solid copolymer ($1.30 \text{ g}/\text{cm}^3$). The value of ρ_a was determined using equation; $\rho_a = m_{\text{dry}}/[m_{\text{dry}}/\rho_c + (m_{\text{wet}} - m_{\text{dry}})/\rho_w]$, where; ρ_w - density of water at 20°C ($0.998 \text{ g}/\text{cm}^3$), m_{dry} - mass of scaffold after drying, m_{wet} - mass of scaffold soaked with water.

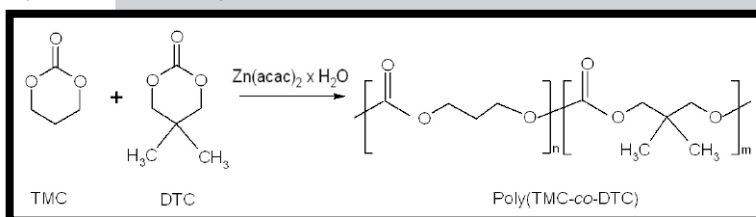
Tensile strength and Young's modulus of copolymers in the form of moldings, formed by compression using a hydraulic press, were determined on Instron 2402 testing machine. Tensile tests were carried out at 23°C , with stretch rate of $20 \text{ mm}/\text{min}$ and a span of jaws 30 mm . Compressive strength of scaffold was performed on a testing machine “Instron” model 1195. The study was conducted at 23°C with strain rate of $2 \text{ mm}/\text{min}$.

The conversion of the reaction and the microstructure of the obtained copolymers were determined by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The ^1H NMR spectra were recorded at 600 MHz with Avance II Bruker TM at 25°C . Dried deuterated chloroform (CDCl_3) was used as the solvent, and tetramethylsilane (TMS) was applied as the internal standard. The ^1H NMR spectra were obtained with 64 scans, 2.65-s acquisition time, and $11 \mu\text{s}$ pulse width. The ^{13}C NMR spectra were recorded at 150 MHz with 19500 scans, 0.91 s acquisition time, and $9.1 \mu\text{s}$ pulse width. Assigning lines from the ^{13}C NMR spectrum to corresponding comonomeric sequences enables the determination of average lengths of carbonate microblocks.

Results and Discussions

The results of the polymerization of TMC, DTC and copolymerization of this monomers in the presence of zinc acetylacetonate monohydrate (II) - $\text{Zn}(\text{acac})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, are summarized in TABLE 1. All reactions were carried out in the bulk with an initiator/ comonomers ratio of $1:800$, at temperature 130°C . This temperature is slightly above the melting point of the monomer DTC and allows to obtain homogeneity of reaction mixture.

In the presence of $\text{Zn}(\text{acac})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, TMC polymerization proceeded with high yields and unexpected rate and allowed to obtain a poly(trimethylene carbonate) with high molar mass [6]. However, the homopolymerization of DTC proceeded more slowly, and the molar mass M_n of DTC was more than twice lower than the theoretically calculated molar mass. These differences were not caused by a “back-biting” reaction type, because at any stage of polymerization, there was no significant increase in dispersion of M_w/M_n , and the molar mass increase with the progress of reaction was directly proportional [6].



SCHEMAT 1. Reakcja otrzymywania kopolimeru węglanu 1,3-trimetyleny z węglanem 2,2-dimetylotrimetyleny.
SCHEME 1. Synthesis of 1,3-trimethylene carbonate with 2,2-dimethyltrimethylene carbonate copolymer.

TABELA 1. Wyniki kopolimeryzacji TMC-DTC, inicjowanej $Zn(acac)_2 \times H_2O$, prowadzonej w stopie w $t = 130^\circ C$ przy stosunku molowy I/M = 1:800.
TABLE 1. Results of copolymerization of TMC with DTC, initiated by $Zn(acac)_2 \times H_2O$, carried out in bulk at $130^\circ C$, initiator/monomers molar ratio of 1:800.

Lp. No.	(TMC:DTC) ^N [% mol]	M _n [kDa]	E [MPa]	σ _{max} [MPa]	ε _{max} [%]	T _{10%} [°C]	T _{max} [°C]
1	20:80	67.5	141	12	390	280	310
2	51:49	48.4	2.6	0.4	93	260	320
3	80:20	63.7	2.5	0.3	92	280	340

Gdzie: E - moduł Younga, σ_{max} - naprężenie na granicy plastyczności, ε_{max} - maksymalne wydłużenie, T_{10%} - temperatura, przy której ulega rozkładowi 10% badanej próbki, T_{max} - temperatura rozkładu próbki.

Where: E - Young's modulus, σ_{max} - stress at yield, ε_{max} - maximum tensile strain, T_{10%} - temperature of 10% degradation, T_{max} - the decomposition temperature

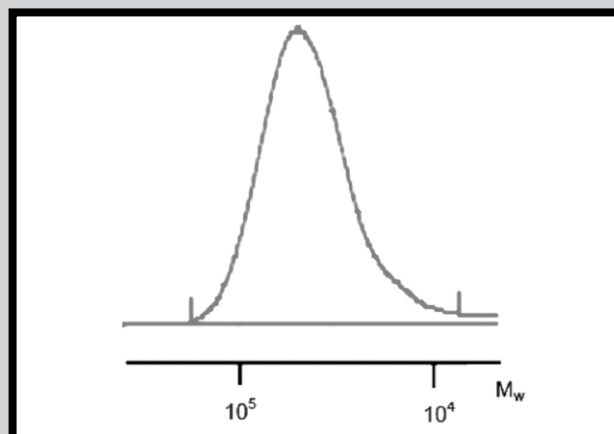
Kopolimery TMC/ DTC również zostały otrzymane w stosunkowo krótkim czasie, z konwersją monomerów sięgającą powyżej 97% (TABELA 1). Czas reakcji został określony na podstawie zależności pomiędzy czasem reakcji a konwersją monomerów w przypadku równomolowej kopolimeryzacji, prowadzonej w $130^\circ C$. Kopolimery te charakteryzowały się wysokimi masami molowymi oraz monomodalnym, wąskim rozrzutem mas molowych (RYS. 1).

Przeprowadzone badania dotyczące kopolimeryzacji wykazały, że oba komonomery węglanowe TMC i DTC w budowywane były w rosnący łańcuch kopolimeru ze zbliżoną szybkością. Średnie długości mikrobloków również przez cały proces formowania się łańcucha kopolimeru były zbliżone do siebie. Świadczy to o tym, że podczas badanej kopolimeryzacji nie zachodził proces transestryfikacji.

Wykorzystując metodę różnicowej kalometrii skaningowej (DSC) zbadano właściwości termiczne otrzymanych kopolimerów węglanu 1,3-trimetyleny z węglanem 2,2-dimetylotrimetyleny o różnych składach komonomerów (RYS. 2). Na termogramie poli(TMC-ko-DTC) o zawartości 80% DTC, obserwowano wyraźny obszar topnienia świadczący o jego semikrystaliczności i podobnie jak w przypadku homopolimeru DTC obserwuje się dwie temperatury topnienia (RYS. 2a). Pozostałe kopolimery były amorficzne (RYS. 2b,c).

Wraz z obniżaniem się zawartości jednostek węglanowych DTC w kopolimerze, wpływających na ich krystaliczność, zaobserwowano znaczne pogorszenie się parametrów wytrzymałości mechanicznej (TABELA 2).

Pomiary przeprowadzone metodą TGA wykazały, że wszystkie otrzymane kopolimery poli(TMC-ko-DTC) charakteryzowały się wysoką stabilnością termiczną, co ma duże znaczenie przy przetwórstwie. Spośród badanych kopolimerów węglanu trimetyleny z węglanem 2,2-dimetylotrimetyleny, kopolimer o zawartości 80% mol. DTC charakteryzuje się najwyższą elastycznością (maks. wydłużenie przy rozciąganiu ponad 390%) oraz najlepszymi parametrami wytrzymałości mechanicznej. Z tego powodu materiał ten wytypowano do zbadania potencjalnej jego przydatności jako materiału do formowania elastycznego, trójwymiarowego porowatego nośnika komórek do zastosowań w inżynierii tkankowej.



RYS. 1. Chromatogram GPC poli(TMC-ko-DTC) (50:50), otrzymanego z zastosowaniem $Zn(acac)_2 \times H_2O$ jako inicjatora (TABELA 1, POZ. 3) (M_n = 48 400 Da, M_w/M_n = 1,9).
FIG 1. GPC chromatogram of poly(TMC-co-DTC) (50:50), obtained using $Zn(acac)_2 \times H_2O$ as initiator (TABLE 1, NO 3) (M_n = 48 400 Da, M_w/M_n = 1.9).

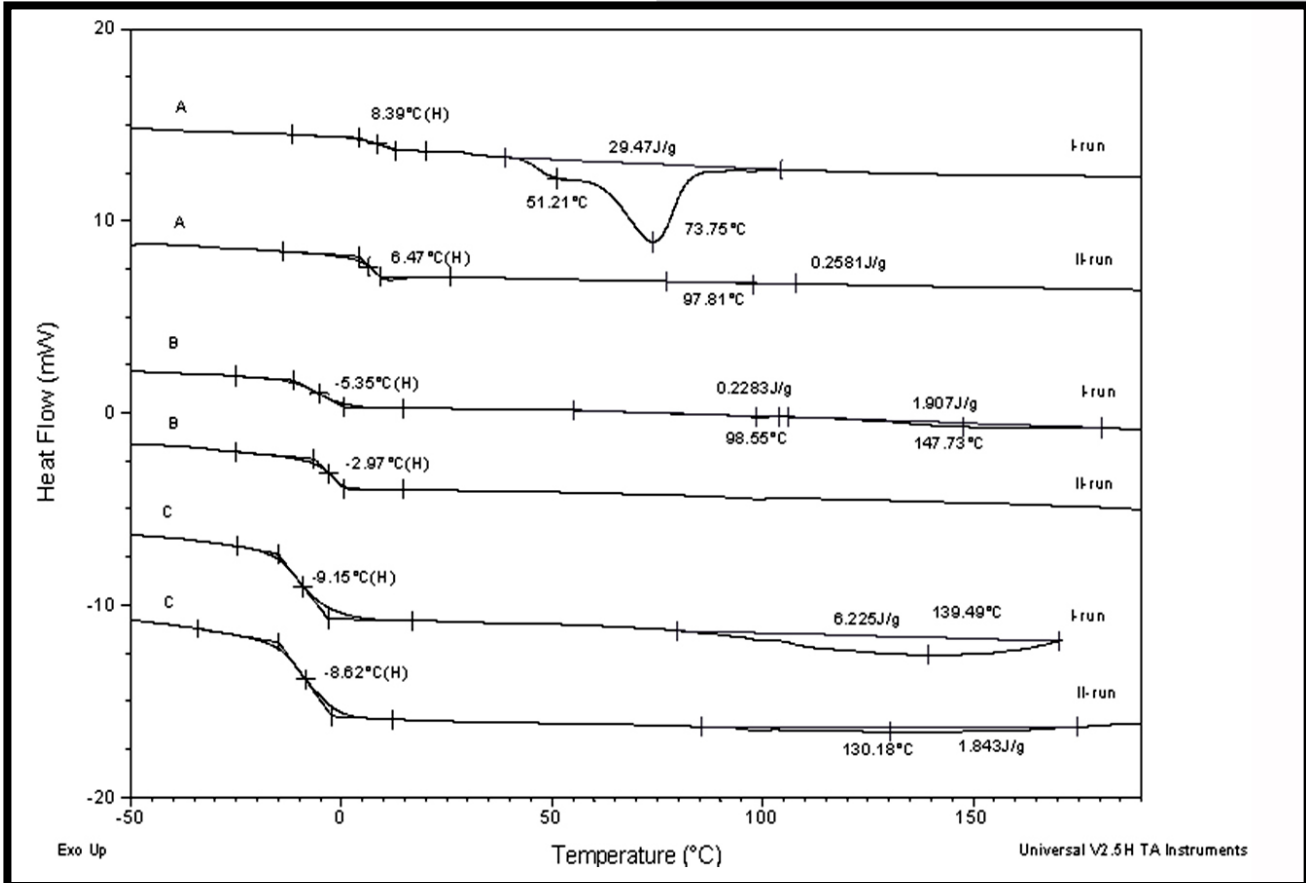
Copolymers of TMC/DTC also have been obtained in a relatively short time, with the conversion of monomers up to above 97% (TABLE 1). The reaction time was determined on the basis of the previous investigations of relation between reaction time and monomers conversion of the equimolar copolymerization conducted at $130^\circ C$. These copolymers are characterized by high molar masses and monomodal, narrow molar mass distribution (FIG. 1).

The study of copolymerization showed that both carbonate comonomers TMC and DTC were incorporated into the growing chain of the copolymer with a similar rate. The average length of microblocks through the whole process of forming a copolymer chain was also similar to each other. This indicates, that during the copolymerization study the transesterification process was not present.

The thermal properties of synthesized copolymers of TMC with DTC, obtained with different comonomer feed ratios (FIG. 2) were examined by the differential scanning calorimetry (DSC). In the thermogram of poly(TMC-co-DTC) containing of the 80% DTC, was shown a clear area providing of the melting semicrystallinity and, as in the case of homopolymer DTC, two melting points (FIG. 2a) were observed. Other obtained copolymers were amorphous (FIG. 2b,c).

The lowering of the content of DTC units in the synthesized copolymer, affected of their semicrystallinity disappearance and simultaneously a significant deterioration of mechanical strength parameters was observed (TABLE 2).

The measurements conducted with TGA showed that all obtained poly(TMC-co-DTC) present high thermal stability, which is especially important for thermo processing. Among the studied copolymers of TMC with DTC, copolymer containing 80 mol % DTC provides the highest flexibility (a tensile elongation of over 390%) and the best parameters of mechanical strength. For this reason, this material was chosen to further investigation of its potential usefulness for manufacturing a flexible, three-dimensional scaffold, which can be used in cell culture. Tissue engineering is a new but very promising area of medicine. Its aim is to regenerate and restore damaged tissues or organs. Bioresorbable three-dimensional scaffolds colonized with cells prior to implantation has just played a significant role in tissue engineering. Under the right conditions and to access to medium, these cells are multiplying and diversifying and only so prepared scaffolds can be implanted into the body cavity tissue in place.



RYS. 2. Termogramy DSC (I i II przebieg) kopolimerów TMC/DTC o zawartości: a) 20 mol % TMC, b) 51 mol % TMC, c) 80 mol % TMC.

FIG. 2. DSC thermograms (I and II run) of TMC/DTC copolymers: a) about 20 mol % of TMC, b) about 51 mol % of TMC, c) about 80% mol of TMC.

TABELA 2. Właściwości mechaniczne i stabilność termiczna kopolimerów TMC/DTC.
TABLE 2. Mechanical properties and thermal stability of the TMC/DTC copolymers.

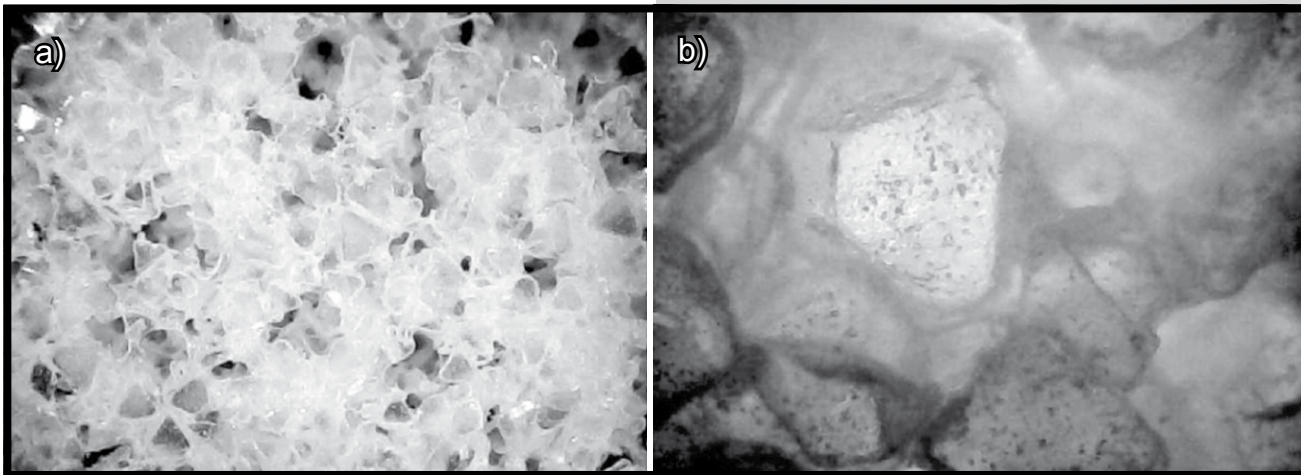
Lp. No.	(TMC:DTC) ⁰ [% mol]	Czas/Time [min]	Konw./Conv. [%]	(TMC:DTC) ^N [% mol.]	M _n [kDa]	D	L _{TMC}	L _{DTC}	R
1	100:0	6	~100	100:0	102	2.0	-	-	-
2	80:20	40	~100	80:20	63.7	2.0	5.3	1.3	0.95
3	50:50	40	97	51:49	48.4	1.9	2.1	2.1	0.95
4	20:80	40	~100	20:80	67.5	1.9	1.3	5.2	0.96
5	0:100	240	99	0:100	34.7	2.3	-	-	-

Gdzie: (TMC:DTC)⁰ - początkowy skład mieszaniny reakcyjnej; Konw. - całkowita konwersja kopolimeryzacji; (TMC:DTC)^N - skład kopolimeru; M_n - liczbowa średnia masa molowa wyznaczona metodą GPC w oparciu o wzorce polistyrenowe; D = M_w/M_n - dyspersja; L_{TMC}, L_{DTC} - średnia długość mikrobloków węglanowych TMC i DTC wyznaczona na podstawie NMR; R - współczynnik randomizacji łańcucha (beźładność łańcucha).

Where: (TMC:DTC)⁰ - initial feed molar fraction TMC and DTC; Conv. - total conversion of copolymerization; (TMC:DTC)^N - feed molar fraction of TMC and DTC; M_n - number average molecular mass were determined by GPC and calibrated with polystyrene standards; D = M_w/M_n - dispersity; L_{TMC}, L_{DTC} - average length of carbonates microblock calculated with NMR; R - degree of chain randomness.

Na RYS. 3 przedstawiono obrazy skafoldu uformowanego z poli(TMC-ko-DTC) o zawartości 80% mol. DTC, uzyskane za pomocą mikroskopu optycznego. Otrzymane podłoże polimerowe charakteryzowało się średnią wielkością porów około 100-200 μm, a ich udział objętościowy wyniósł 83%. Właściwości mechaniczne tego skafoldu (moduł sprężystości na ściskanie E_c = 1,8 MPa i wytrzymałość na ściskanie σ_{c,max} = 0,75 MPa) są porównywalne z właściwościami mechanicznymi elastomerów poliuretanowych [9].

FIG. 3 shows images of the scaffold formed from poly(TMC-co-DTC) containing 80% of DTC units, obtained with an optical microscope. The resulting scaffold was characterized by a mean pore size of 100-200 μm and a pore volume fraction was about 83%. Mechanical properties of this scaffold (modulus of compression elasticity about E_c = 1.8 MPa and compressive strength about σ_{c,max} = 0.75 MPa) are comparable with the mechanical properties of the polyurethane elastomers [9].



RYS. 3. Obraz z mikroskopu optycznego porowatych podłoży na bazie kopolimerów TMC/DTC: a) powiększenie 20x, światło odbite, b) powiększenie 80x, światło prześwitujące.

FIG. 3. Optical microscope image of porous scaffold based on copolymers TMC/DTC: a) 20x magnification, reflected light, b) 80x magnification, light translucent.

Odpowiednia wytrzymałość mechaniczna i elastyczność kopolimerów węglanu trimetyleny z węglanem 2,2-dimetylotrimetyleny sprawiają, że te nowe materiały wydają się obiecującym materiałem w formowaniu porowatych, trójwymiarowych podłoży do hodowli tkanek miękkich, takich jak przykładowo: skóra czy naczynia krwionośne.

Wnioski

W obecności $Zn(acac)_2 \times H_2O$ otrzymano kopolimery węglanu trimetyleny z węglanem 2,2-dimetylotrimetyleny o wysokich masach cząsteczkowych, w stosunkowo krótkim czasie. Właściwości termiczne i mechaniczne tych kopolimerów silnie zależały od składu poszczególnych komonomerów. Otrzymane wstępne wyniki badań sugerują, że podłoża formowane z kopolimerów węglanu trimetyleny z węglanem 2,2-dimetylotrimetyleny mogłyby znaleźć potencjalne zastosowanie jako elastyczne, trójwymiarowe skafoldy do hodowli tkanek miękkich.

Podziękowania

Prace wykonano w ramach projektu „Polimerowe chirurgiczne systemy resorbowalne z pamięcią kształtu” nr UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-05, finansowanego z funduszy strukturalnych.

Piśmiennictwo

- [1] Pêgo A.P., van Luyn M.J.A., Brouwer L.A., van Wachem P.B., Poot A.A., Grijpma D.W., Feijen J.: In vivo behavior of poly(1,3-trimethylene carbonate) and copolymers of 1,3-trimethylene carbonate with D,L-lactide or epsilon-caprolactone: Degradation and tissue response. *Journal of Biomedical Materials Research* 67 (2003) 1044-1054.
- [2] Pêgo A.P., Grijpma D.W., Feijen J.: Enhanced mechanical properties of 1,3-trimethylene carbonate polymers and networks. *Polymer* 44 (2003) 6495-6504.
- [3] Rokicki G.: Aliphatic cyclic carbonates and spiroorthocarbonates as monomers. *Progress in Polymer Science* (2000) 25259-342.
- [4] Ling J., Shen Z.Q.: Lanthanum Tris(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenolate) as a Novel, Versatile Initiator for Homo- and Copolymerization of Cyclic Carbonates and Lactones. *Macromolecular Chemistry and Physics* 203 (2002) 735.
- [5] Zhu W., Ling J., Xu H., Shen Z.: Copolymerization of trimethylene carbonate and 2,2-dimethyltrimethylene carbonate by rare earth calixarene complexes. *Polymer* 46 (2005) 8379-8385.

The mechanical strength and flexibility of the copolymers of trimethylene carbonate/2,2-dimethyltrimethylene carbonate make that these new materials are ideal for the formation of porous three-dimensional scaffolds for the cultivation of soft tissues, as for example: skin and blood vessels.

Conclusions

In the presence of $Zn(acac)_2 \times H_2O$, in a relatively short time, high molecular weight copolymers of trimethylene carbonate with 2,2-dimethyltrimethylene carbonate were obtained. The thermal and mechanical properties of these copolymers were strongly dependent on the comonomer composition. The obtained preliminary results suggest that the scaffold formed from a copolymer of trimethylene carbonate with 2,2-dimethyltrimethylene carbonate could have potential application as a flexible, three-dimensional scaffold for soft tissue culture.

Acknowledgments

This work has been financially supported by European Regional Development Found, Project No. UDA POIG.01.03.01-123/08-05, „Bioresorbable surgery systems with shape memory properties”.

References

- [6] Dobrzyński P., Pastusiak M., Bero M.: Less Toxic Acetylacetonates as Initiators of Trimethylene Carbonate and 2,2-Dimethyltrimethylene Carbonate Ring Opening Polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 43 (2005) 1913-1922.
- [7] Pamuła E., Błażewicz M., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M., Kasperczyk J.: Elaboration and characterization of biodegradable scaffolds from poly(L-lactide-co-glycolide) synthesized with low-toxic zirconium acetylacetonate. *Annals of Transplantation* 9 (2004) 64-67.
- [8] Pamuła E., Błażewicz M., Bero M., Dobrzyński P.: Scaffolds from biodegradable aliphatic polyesters for tissue engineering. *Engineering of Biomaterials* 17-19 (2001) 15.
- [9] Grad S., Kupsik L., Gorna K., Gogolewski S., Alini M.: The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials* 24 (2003) 5163-5171.



.....

STUDIA PODYPLOMOWE
Biomateriały – Materiały dla Medycyny
2013/2014

Organizator: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów	Adres: 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 208 lub p. 501 tel. 12 617 44 48; fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl
Kierownik: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH	http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny.html
Charakterystyka: Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Studenci zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów, a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Studenci zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
Sylwetka absolwenta: Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia), a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biogodności materiałów.	
Zasady naboru: Termin zgłoszeń: od 20.09.2013 do 20.10.2013 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Miejsce zgłoszeń: Kraków, Al. Mickiewicza 30, Pawilon A3, p. 208 lub p. 501 Osoby przyjmujące zgłoszenia: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Mgr inż. Małgorzata Krok (tel. 12 617 47 44, e-mail: krok@agh.edu.pl)	
Czas trwania: 2 semestry (od XI 2013 r. do VI 2014 r.)	Opłaty: 2 600 zł
Informacje dodatkowe: Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160.	

