

DEGRADACJA RUSZTOWAŃ KOLAGENOWYCH W WARUNKACH IN VITRO

JUSTYNA KOZŁOWSKA^{1*}, ALINA SIONKOWSKA¹,
ANNA BAJEK², ALDONA RYNKIEWICZ²

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU:

¹WYDZIAŁ CHEMII, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ

²COLLEGIUM MEDICUM, IM. LUDWIKA RYDYGIERA,
ZAKŁAD INŻYNIERII TKANKOWEJ,
UL. KARŁOWICZA 24, 85-092 BYDGOSZCZ

*E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 122-123, (2013), 34-36*]

Wprowadzenie

Kolagen jest powszechnie stosowany jako biomateriał. Białko to znalazło zastosowanie w wielu aplikacjach biomedycznych, a w szczególności w inżynierii tkankowej [1,2]. Wadą kolagenu jako biomateriału przeznaczonego do regeneracji uszkodzonych tkanek jest jego wysoka podatność na degradację in vitro, co prowadzi ostatecznie do obniżenia właściwości mechanicznych materiału [3]. Podjęto wiele starań, aby poprawić odporność na degradację materiałów kolagenowych. Jednym z rozwiązań jest modyfikacja tych biomateriałów metodą sieciowania przy użyciu różnych czynników sieciujących. Obecnie stosowane są zarówno chemiczne, jak i fizyczne czynniki sieciujące materiały białkowe [4,5].

Celem pracy było zmodyfikowanie materiałów kolagenowych przy użyciu fizycznych i chemicznych środków sieciujących. Aby porównać efektywność zastosowanych metod sieciowania, oznaczono stopień degradacji tych materiałów w warunkach in vitro. Ponadto wykonane zostały wstępne badania biologiczne, oceniające biogodność modyfikowanych materiałów kolagenowych.

Materiały i metodyka

Kolagen otrzymano ze ścięgien ogonów szczurzych w warunkach laboratoryjnych. Przygotowano 1% (w/w) roztwór kolagenu z liofilizatu tego białka. Metodą liofilizacji otrzymano wysoce porowate, trójwymiarowe materiały kolagenowe (skafoldy). W celu modyfikacji właściwości fizykochemicznych tych matryc zastosowano następujące metody sieciowania:

a) sieciowanie przy użyciu mieszaniny sieciującej EDC/NHS, gdzie EDC to 1-etylo-3(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid, natomiast NHS to imid N-hydroksy-kwasu bursztynowego,

b) próżniowa dehydratacja (DHT) w temperaturze 110°C prowadzona przez 24h,

c) kombinacja wyżej opisanych metod: DHT-EDC/NHS – próbki zmodyfikowano metodą dehydratacji próżniowej, po czym zastosowano sieciowanie chemiczne przy użyciu mieszaniny sieciującej EDC/NHS.

Próbki umieszczono w buforze PBS (pH=7,4) w temperaturze 37°C. Po 1, 2, 3, 7, 21 i 42 dniach próbki wyjmowano z buforu, trzykrotnie przemywano wodą dejonizowaną, po czym zamrażano i suszono sublimacyjnie w liofilizatorze do stałej masy. Po zważeniu próbek obliczono procentowy ubytek masy. Przedstawione wyniki są średnią z pomiarów wykonanych dla 3 próbek z każdego rodzaju.

IN VITRO DEGRADATION OF COLLAGEN SCAFFOLDS

JUSTYNA KOZŁOWSKA^{1*}, ALINA SIONKOWSKA¹,
ANNA BAJEK², ALDONA RYNKIEWICZ²

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, TORUN, POLAND:

¹FACULTY OF CHEMISTRY, BIOPOLYMER RESEARCH GROUP,
7 GAGARIN STR., 87-100 TORUN, POLAND

²LUDWIK RYDYGIER COLLEGIUM MEDICUM,
DEPARTMENT OF TISSUE ENGINEERING,
24 KARŁOWICZ STR., BYDGOSZCZ, POLAND

*E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Engineering of Biomaterials, 122-123, (2013), 34-36*]

Introduction

Collagen is a highly versatile biomaterial. This protein has been used in a wide range of biomedical applications but mainly in the field of tissue repair [1,2]. The disadvantage of using collagen as a biomaterial for tissue repair is its high degradation rate, which leads rapidly to a loss of mechanical properties [3]. Many attempts have been made to overcome this problem. The physical properties of collagen biomaterials are improved by applying different crosslinking method. At present, different chemical and physical crosslinking methods are used for crosslinking of protein materials [4,5].

The aim of this study was to study the chemical and physical cross-linking of collagen scaffolds. To compare the effectiveness of different methods of crosslinking the in vitro degradation of collagen scaffolds were measured. Moreover, the biological tests were performed to verify biocompatibility of collagen matrices tested.

Materials and methods

Collagen was obtained in our laboratory from the tail tendons of young rats. Collagen solutions with concentrations of 1% (w/w) were prepared from lyophilized collagen in deionized water. The high porous collagen scaffolds were produced from a collagen solution using a freeze-drying technique. The lyophilized porous samples were stabilized using different treatment methods:

a) crosslinking with EDC/NHS, where EDC is N-(3-dimethylamino propyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride and NHS is N-hydroxysuccinimide,

b) dehydrothermal treatment (DHT) under a vacuum at a temperature of 110° C for 24h,

c) DHT and then crosslinking with EDC/NHS.

The samples were immersed in PBS (pH=7.4) at 37°C for 1, 2, 3, 7, 21 and 42 days. At each time point, they were removed from the PBS buffer, rinsed with deionization water three times, lyophilized and weighed. The percentage weight loss was calculated from dry weight before and after being immersed in PBS. The experiment was carried out for three samples and the average value was recorded.

Mouse fibroblast cell line 3T3 were seeded in the number of 1×10^6 cells/cm² and incubated for 7 days. After incubation, MTT assay was performed to assess the viability of 3T3 cells.

Ponadto wykonane zostały badania biologiczne materiałów kolagenowych. Do badań wykorzystano stałą linię fibroblastów mysich 3T3, które wysiewano w liczbie $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$ biomateriału. Hodowlę prowadzono w pożywce w temperaturze 37°C przez 7 dni. Po tym okresie wykonano test MTT, by ocenić przeżywalność komórek.

Wyniki i ich omówienie

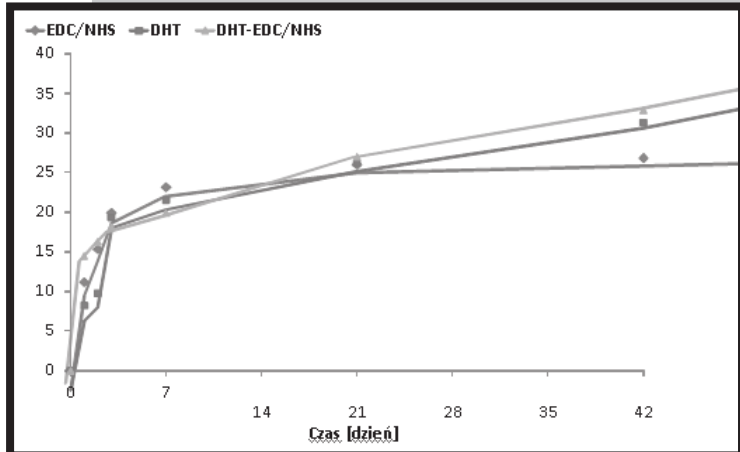
RYS.1 przedstawia wartości ubytków masy skafoldów kolagenowych usieciowanych metodami: EDC/NHS, DHT oraz DHT-EDC/NHS. Największy ubytek masy zaobserwowano w ciągu pierwszych siedmiu dni analizy. Po 7 dniach inkubacji w buforze PBS masa próbek zaczęła ulegać stopniowej stabilizacji. Po 42 dniach analizy próbki sieciowane przy użyciu EDC/NHS utraciły 26,8% początkowej masy, natomiast materiały sieciowane metodą DHT utraciły 31,3% początkowej masy. Największy ubytek masy zaobserwowano w przypadku próbki usieciowanej metodą DHT-EDC/NHS (32,9% po 42 dniach inkubacji w roztworze PBS).

Cytotoksyczność badanych próbek wobec fibroblastów oznaczono za pomocą testu MTT. Na RYS.2 przedstawiono zdjęcia materiałów kolagenowych po badaniach biologicznych w warunkach in vitro. Wyniki testu MTT wskazują, że wszystkie otrzymane materiały kolagenowe są biogodne. Jakościowa analiza intensywności zabarwienia MTT wskazuje, iż matryca kolagenowa usieciowana metodą dehydratacji próżniowej charakteryzuje się najlepszą biogodnością dla komórek. Komórki wniknęły do wnętrza porów materiału i równomiernie zasiedliły strukturę matrycy. Natomiast po usieciowaniu materiałów kolagenowych czynnikami chemicznymi – EDC/NHS – zaobserwowano mniej intensywne zabarwienie takich materiałów po teście MTT, co oznacza mniejszą liczbę żyjących komórek.

Results and discussion

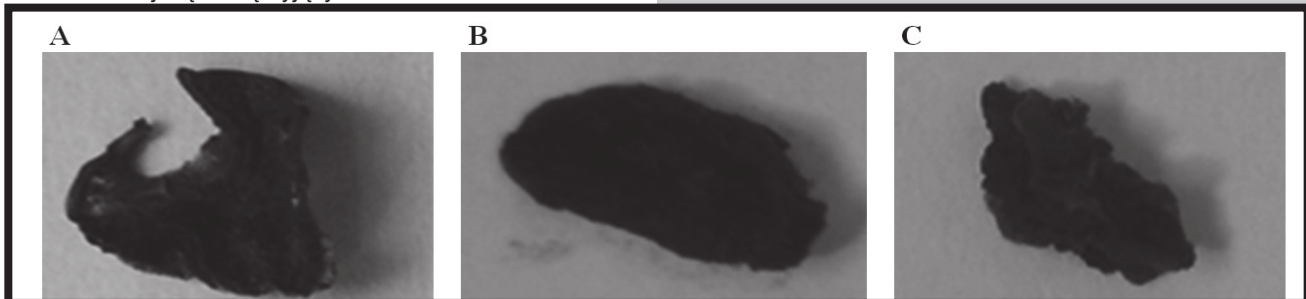
FIG.1 shows the weight loss of collagen scaffolds crosslinked by EDC/NHS, DHT and DHT-EDC/NHS. The biggest weight loss was observed during the first seven days of analysis. After 7 days the cross-linked collagen scaffolds dissolved slowly in PBS solution, losing: 26.8% for collagen scaffold cross-linked by EDC/NHS and 31.3% for collagen scaffold cross-linked by DHT. However, the collagen matrices crosslinked by DHT-EDC/NHS lost more weight during their period in PBS than the EDC/NHS and DHT crosslinked samples (32.9% in 42 days).

In this study, a MTT assay was carried out to measure the relative viability of fibroblasts. Photographs of prepared scaffolds after in vitro testing are shown in FIG.2.



RYS.1. Wartości ubytków masy w czasie matryc kolagenowych zanurzonych w buforze PBS w temp. 37°C .

FIG.1. Weight loss [%] of collagen scaffolds vs. time in PBS at 37°C .



RYS.2. Zdjęcia matryc kolagenowych usieciowanych przy użyciu: a) EDC/NHS, b) DHT; c) DHT-EDC/NHS.

FIG.2. Images of the collagen scaffolds crosslinked by: a) EDC/NHS, b) DHT; c) DHT-EDC/NHS.

Wnioski

Celem pracy było określenie stopnia degradacji usieciowanych materiałów kolagenowych, a także wstępna ocena ich właściwości biologicznych. Stopień degradacji wszystkich badanych próbek jest zbliżony i po 42 inkubacji w buforze PBS wynosi ok. 30%. Na podstawie uzyskanych wyników widzimy, że wszystkie próbki są dobrze tolerowane przez komórki. Najlepsze warunki dla przyczepności komórek oraz ich proliferacji zapewniła matryca kolagenowa zmodyfikowana metodą DHT, dzięki czemu może ona znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej.

Podziękowania

Badania były współfinansowane z grantu Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika z dotacji statutowej dla młodych naukowców: Ch1494.

MTT test showed that all samples are biocompatible for the fibroblast 3T3. The qualitative analysis of color intensity resulting from MTT analysis shows that the collagen scaffold crosslinked by dehydrothermal treatment is the best matrix for the cell. The cells migrated into the pores of scaffold and were evenly distributed into the structure of scaffold. These results revealed that the DHT-crosslinked collagen scaffolds were noncytotoxic and benefitted the viability of cells. When EDC/NHS was used as crosslinking agent less living cells was observed after MTT test.

- [1] Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res* 2008;63:492-496.
- [2] Gee AO, Baker BM, Silverstein AM, et al. Fabrication and evaluation of biomimetic-synthetic nanofibrous composites for soft tissue regeneration. *Cell Tissue Res* (2012) 347:803-813.
- [3] Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2004;32:477-486.
- [4] Sionkowska A, Skopinska-Wisniewska J, Gawron M, Kozłowska J, Planecka A. Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates. *Int J Biol Macromol* 2010;47(4):570-577.
- [5] Parentau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials* 2010;3(3):1863-1887.

WIELOWARSTWOWA UNIwersalna POWŁOKA OCHRONNO-TERAPEUTYCZNA NA IMPLANTY – KONTROLOWANE UWALNIANIE LEKU Z PARYLENU C MODYFIKOWANEGO PLAZMĄ TLENOWĄ

M.GOLDA^{1*}, K.GĘBAROWSKA², M.MUSIAŁ-KULIK²,
J.KASPERCZYK^{2,3}, A.KOTARBA¹

¹UNIERSYTET JAGIELLOŃSKI, WYDZIAŁ CHEMII,
UL. INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW, POLSKA

²POLSKA AKADEMIA NAUK,
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH
UL. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-800 ZABRZE, POLSKA

³ŚLĄSKI UNIERSYTET MEDYCZNY,
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, KATEDRA BIOFARMACJI,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

*E-MAIL: GOLDA@CHEMIA.UJ.EDU.PL

Streszczenie

Opracowano wielowarstwową ochronną powłokę polimerową na bazie parylenu C, którą modyfikowano plazmą tlenową. Przeprowadzono badania składu chemicznego powierzchni (XPS) i Swobodnej Energii Powierzchniowej (kąta zwilżania, metoda Owens-Wendta) próbek modyfikowanego parylenu C. Otrzymano matryce z bioresorbowalnego kopolimeru L-laktydo-ko-glikolidu (PLGA) zawierające cząsteczki modelowego leku przeciwbólowego (ibuprofen), następnie matryce poddano degradacji hydrolytycznej oraz ocenie profilu uwalniania substancji leczniczej. Zmiany zachodzące w mikrostrukturze łańcucha kopolimerowego obserwowano przy wykorzystaniu wysokorozdzielczej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), natomiast kinetykę uwalniania leku z matryc badano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Słowa kluczowe: parylen C, plazma tlenowa, swobodna energia powierzchniowa, powierzchnia implantów, kontrolowane uwalnianie leków.

[*Inżynieria Biomateriałów*, 122-123, (2013), 36-39]

Conclusions

In this study, we perform the degradation characterization and preliminary assessment of the biological performance of crosslinked collagen porous scaffolds. The degree of degradation of all samples was quite similar ($\approx 30\%$ in 42 days). Based on the obtained results, all samples are well tolerated by the cells. However, DHT-crosslinked scaffolds especially promoted the attachment and viability of cells and may serve as a suitable 3D matrix for tissue engineering applications.

Acknowledgments

This work was supported in part by the grant of Faculty of Chemistry Nicolaus Copernicus University Ch1494.

MULTILAYER VERSATILE PROTECTIVE AND THERAPEUTIC COATING FOR IMPLANTS - CONTROLLED DRUG DELIVERY FROM OXYGEN PLASMA TREATED PARYLENE-C

M.GOLDA^{1*}, K.GĘBAROWSKA², M.MUSIAŁ-KULIK²,
J.KASPERCZYK^{2,3}, A.KOTARBA¹

¹JAGIELLONIAN UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY,
3 INGARDEN STR., 30-060 KRAKÓW, POLAND

²POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS
34 SKŁODOWSKA-CURIE STR., 41-800 ZABRZE, POLAND

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

*E-MAIL: GOLDA@CHEMIA.UJ.EDU.PL

Abstract

The multilayer protective polymer coating based on parylene C modified with oxygen plasma was developed. The paper reports an investigation on surface chemical composition (XPS) and surface free energy (contact angle, Owens-Wendt) of modified parylene C. Bioresorbable L-lactide-co-glycolide copolymer (PLGA) was used to obtain drug-loaded matrices. The matrices underwent hydrolytic degradation and estimation of drug release profile. The microstructural changes which appeared during degradation were observed by means of high resolution nuclear magnetic spectroscopy (NMR). The kinetic profiles of drug release were investigated with high performance liquid chromatography (HPLC).

Keywords: parylene C, oxygen plasma, surface free energy, implant surface, controlled drug delivery
[*Engineering of Biomaterials*, 122-123, (2013), 36-39]