

CHARAKTERYSTYKA USIECIOWANYCH MATERIAŁÓW KOLAGENOWYCH

JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA^{1*}, NINA ŁUCZYŃSKA¹,
ANNA BAJEK², ALDONA RYMKIEWICZ², ALINA SIONKOWSKA¹

¹ WYDZIAŁ CHEMII, UNIwersYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ

² COLLEGIUM MEDICUM UNIwersYTETU MIKOŁAJA KOPERNIKA,
UL. KARLOWICZA 24, 85-092 BYDGOSZCZ

* E-MAIL: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

Streszczenie

Trójwymiarowe, porowate materiały kolagenowe są intensywnie badane jako rusztowania dla inżynierii tkankowej. Ich zadaniem jest zastąpienie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), zapewnienie odpowiedniego wsparcia mechanicznego oraz środowiska biologicznego dla komórek oraz nowo formującej się tkanki. Właściwości tych materiałów, takie jak wytrzymałość mechaniczna, porowatość i podatność na degradację mogą być modyfikowane przez sieciowanie. Z tego względu celem pracy było otrzymanie oraz scharakteryzowanie trójwymiarowego materiału z neutralizowanego kolagenu usieciowanego za pomocą N-hydroksyimidu kwasu bursztynowego (NHS).

Stwierdzono, że średni rozmiar porów, stopień spęcznienia, odporność na degradację oraz wytrzymałość mechaniczna uzyskanych materiałów maleje wraz z wydłużeniem czasu sieciowania NHS. Wszystkie próbki wykazują zadowalające właściwości biologiczne, choć uwagę zwraca fakt, że komórki zasiedlają tylko powierzchnię materiału i nie migrują w głąb skafoldu.

Słowa kluczowe: kolagen, inżynieria tkankowa, struktura 3-D, sieciowanie, NHS

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 46-51]

Wprowadzenie

Każdego roku tysiące ludzi cierpi z powodu chorób bądź urazów powodujących nieodwracalne uszkodzenia tkanek. Często konieczne bywa wówczas zastąpienie takiego organu innym materiałem. Zwykle wykorzystuje się narządy pochodzące od dawców lub implanty wytworzone przez człowieka. Pomimo wielu niezaprzeczalnych zalet oba rozwiązania posiadają pewne ograniczenia. Nową obiecującą alternatywą dla tych metod jest inżynieria tkankowa. Od wielu lat trójwymiarowe, porowate matryce są intensywnie badane jako rusztowania dla inżynierii tkankowej. Ich zadaniem jest zastąpienie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), zapewnienie odpowiedniego wsparcia mechanicznego oraz środowiska biologicznego dla komórek oraz nowo formującej się tkanki [1-3]. Wszystkie rodzaje tkanek łącznych zawierają znaczną ilość kolagenu. Białko to posiada dobre właściwości wytrzymałościowe, niską antygenowość, brak cytotoxycywności i nie wywołuje odczynów zapalnych. Wykazuje działanie hemostatyczne i zdolność do kontrolowanej biodegradacji. Materiały kolagenowe wspierają adhezję oraz wzrost komórek i tkanek. Właściwości te sprawiły, że białko to jest stosowane w wielu, różnorodnych zastosowaniach medycznych [3-6].

CHARACTERIZATION OF CROSS-LINKED COLLAGEN MATRICES

JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA^{1*}, NINA ŁUCZYŃSKA¹,
ANNA BAJEK², ALDONA RYMKIEWICZ², ALINA SIONKOWSKA¹

¹ FACULTY OF CHEMISTRY, NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,
GAGARINA 7, 87-100 TORUN, POLAND

² COLLEGIUM MEDICUM, NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,
KARLOWICZA 24, 85-092 BYDGOSZCZ, POLAND

* E-MAIL: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

Abstract

The three-dimensional, porous, collagen scaffolds have been extensively investigated as matrices for tissue engineering. Their task is to replace the extracellular matrix (ECM), provide mechanical support and a biological environment for cells and newly formed tissue. The properties of the materials such as mechanical strength, porosity and susceptibility to degradation can be modified by cross-linking process. For this reason the aim of our work was to obtain and characterize neutralized, 3-D collagen scaffold cross-linked using N-hydroxysuccinimide (NHS) during different time periods.

It was found, that average pore size, swelling degree, the susceptibility to degradation and mechanical properties declined with longer cross-linking time. All samples were well tolerated by the cells. However the cells were distributed only on the surface of the material and did not migrate into the structure of the scaffolds.

Keywords: collagen, tissue engineering, 3-D scaffold, cross-linking, NHS

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 46-51]

Introduction

Every year thousands people suffer from illness or injury which causes irreversible tissue destruction or loss of functionality. Often it is necessary to replace the destroyed organ. Usually this is achieved by organ transplantation from donors or by an artificial organ implantation. Both solutions exhibit some limitations. The new, promising alternative method is tissue engineering. For several years three-dimensional porous scaffolds have been extensively investigated as matrices for tissue engineering. Their task is to replace the extracellular matrix (ECM), provide mechanical support and a biological environment for cells and newly formed tissue [1-3]. All kinds of connective tissues contain a significant amount of collagen. This protein exhibits good mechanical properties, low antigenicity, low inflammatory and cytotoxic responses, good hemostatic properties and controllable biodegradability. It also promotes cell and tissue adhesion and growth. Some of these properties can be changed by a cross-linking process, chemical and physical modifications. For this reason collagen has been used in a variety of medical applications [3-6].

Celem pracy było otrzymanie i scharakteryzowanie trójwymiarowych, porowatych, neutralizowanych materiałów kolagenowych usieciowanych N-hydroksylimidem kwasu bursztynowego (NHS).

Materiały i metody

Roztwór kolagenu (1%) ze ścięgien ogonowych młodych szczurów albinosów w 0,1M kwasie octowym został przygotowany w naszym laboratorium [7]. Następnie roztwór ten umieszczono w tubach dializacyjnych i poddano neutralizacji w procesie dializy względem wody dejonizowanej przez tydzień, aż do uzyskania żelu kolagenowego. Otrzymany materiał sieciowano poprzez zanurzenie w 0,01M roztworze N-hydroksy imidu kwasu bursztynowego (NHS) na 2, 8 i 24 godziny. Żel kolagenowy pocięto na plastry o grubości około 3 mm i liofilizowano przez 48 godzin. Uzyskany w ten sposób porowaty materiał poddano analizom.

Właściwości mechaniczne badano za pomocą maszyny wytrzymałościowej Zwick&Roell Z 0.5. Próbkę umieszczano w uchwytach pomiarowych i kondycjonowano przez 15 min w komorze wypełnionej roztworem buforu fosforanowego (PBS) o pH=7,4, a następnie rozciągano z szybkością 10 mm/min.

Zdjęcia morfologii materiałów kolagenowych zarejestrowano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego wyprodukowanego przez LEO Electron Microscopy Ltd, England, model 1430 VP. Przed badaniem próbki napyłano platyną. Za pomocą programu Sigma Scan Pro 5 zmierzono średnie pola powierzchni porów.

Stożek spęcznienia (E_s) mierzono metodą wagową. Suche próbki zważono (W_d) i umieszczono w 0,05M buforze fosforanowym (PBS) o pH=7,4 w temperaturze pokojowej. Po odpowiednim czasie próbki wyciągano, osuszano na bibule filtracyjnej i ważono (W_s). Stożek spęcznienia materiału określano jako stosunek wzrostu masy ($W_s - W_d$) względem masy początkowej próbki W_d . Wartości stanowią średnią z trzech pomiarów. E_s obliczano stosując poniższą zależność:

$$E_s = (W_s - W_d)/W_d \times 100\% \quad (1)$$

gdzie W_s i W_d oznaczają odpowiednio masę spęcznionej i suchej próbki.

Materiał poddano także badaniu degradacji in vitro. Suchą próbkę o znanej masie umieszczono w 0,05M buforze fosforanowym (PBS) o pH=7,4 w temperaturze 37°C. Co 24 godziny próbkę wyciągano z roztworu, kilkakrotnie przemywano wodą destylowaną, zamrażano, liofilizowano, a następnie ważono. Pomiaru wykonywano każdorazowo dla trzech próbek danego rodzaju. Procentowy ubytek masy obliczono przy użyciu poniższego równania:

$$\text{Ubytek masy} = ((W_i - W_f)/W_i) \times 100\% \quad (2)$$

gdzie W_i i W_f oznaczają odpowiednio masę początkową i zdegradowanej próbki [8].

By zbadać przeżywalność i proliferację fibroblastów mysich 3T3 materiały kolagenowe umieszczono w 12-dółkowych płytkach hodowlanych i posiano $2,5 \times 10^4$ komórek na dółek. Komórki hodowano w kompletnym medium hodowlanym przez 7 dni. Następnie medium hodowlane było usuwane, a ilość żywych komórek szacowano stosując test MTT. Zdjęcia materiałów po teście MTT wykonano przy użyciu aparatu cyfrowego Kodak Easy Share Z1012.

Wyniki i dyskusja

Porowatość materiału jest bardzo istotnym parametrem z punktu widzenia inżynierii tkankowej. Porowatość materiałów zastępczych musi mieć charakter otwarty pozwalający na transport masy (składniki odżywcze, produkty przemiany materii) w kierunku prostopadłym do powierzchni materiału.

The aim of this work was to obtain and characterize the porous, three-dimensional, neutralized collagen scaffolds cross-linked using N-hydroxysuccinimide (NHS) during different time periods.

Materials and Methods

The solution of collagen (1%) from tail tendons of young albino rats in 0.1M acetic acid was obtained in our laboratory [7]. This solution was poured into dialysis bag and neutralized during dialysis process against deionised water for one week until a collagen gel was formed. Then the collagen was cross-linked by immersing in 0.01M N-hydroxysuccinimide (NHS) solution for 2, 8 and 24 hours. Finally, the material was cut into slices 3 mm thick and lyophilized for 48 h. The obtained dry porous matrices were analyzed.

The mechanical properties have been investigated by Zwick&Roell Z 0.5. The samples were placed between grips, conditioned 15 min in chamber filled with PBS buffer and stretched (stretching rate 10 mm/min).

The images of morphology of collagen biomaterials were performed by scanning electron microscope made by LEO Electron Microscopy Ltd, England, model 1430 VP. All samples were coated by platinum. The average area of pores was estimated using the Sigma Scan Pro 5 program.

The swelling ratio (E_s) was measured by the conventional gravimetric method. The dry sample was weighted and placed in 0.05M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 at room temperature. After appropriate time of incubation (0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 24 h) excess of phosphate buffer was removed using absorbent paper and wet material was weighted (W_s). The swelling ratio of the scaffolds was defined as the ratio of weight increase ($W_s - W_d$) with respect to the initial weight (W_d) of dry samples. Each value was averaged from three parallel measurements. E_s was calculated using the following equation:

$$E_s = (W_s - W_d)/W_d \times 100\% \quad (1)$$

where W_s and W_d denote the weights of swollen and dry samples, respectively.

In vitro degradation was also analyzed. The scaffolds of known dry weights were placed in 0.05M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) at 37°C. Every 24 hours, samples were removed from the medium, rinsed with distilled water, frozen, lyophilized, and weighed. The experiment was done in triplicates for each scaffold. The percentage of weight loss was calculated using the following equation:

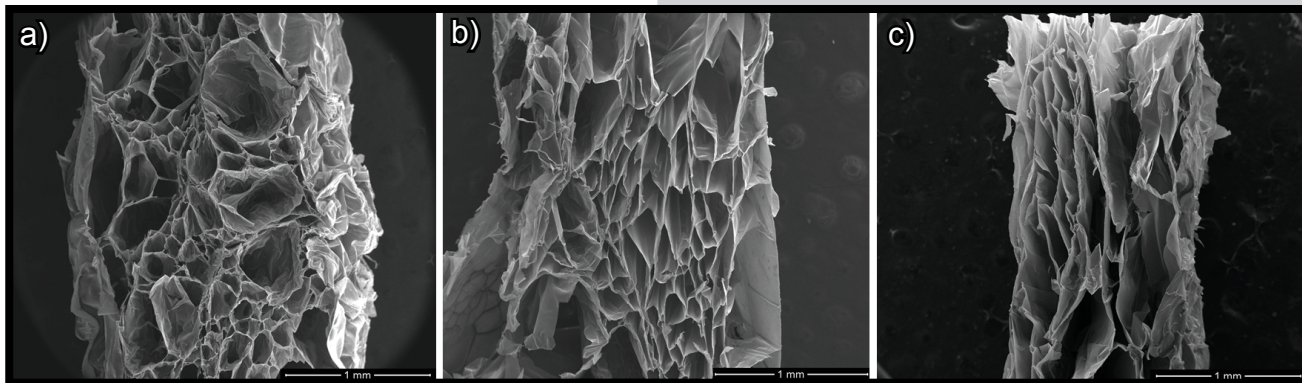
$$\text{Weight loss} = ((W_i - W_f)/W_i) \times 100\% \quad (2)$$

where W_i and W_f represents the initial and digested weight of scaffolds, respectively [8].

To investigate the viability and proliferation cells on collagen matrices fibroblasts 3T3 were seeded on materials placed in 12-well plates at a density of 2.5×10^4 per well. Cells have been growing in complete medium for 7 days. Then culture medium was removed and MTT assay was performed. The images of the samples after MTT test were performed by digital camera Kodak Easy Share Z1012.

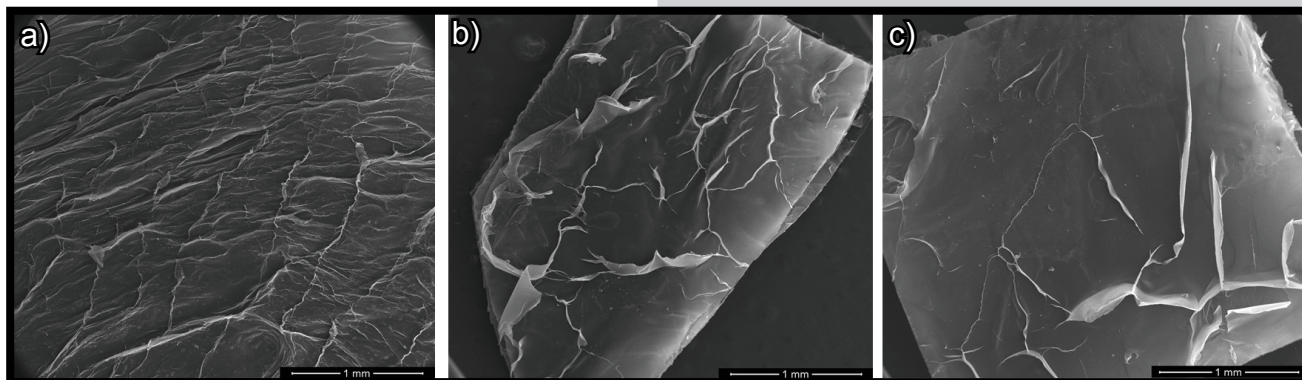
Results and Discussion

The porosity of scaffolds is a very important parameter for tissue engineering. The pores must be open to allow cells to penetrate the matrix and permit the transport of matter (nutrients, waste products) in a direction perpendicular to the surface of the material. The SEM images (FIG. 1) show the inner porous structure of collagen cross-linked materials.



RYS. 1. Obraz SEM wewnętrznej struktury liofilizowanych materiałów kolagenowych sieciowanych przy użyciu NHS przez a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h.

FIG. 1. SEM images of the inner structures of lyophilized collagen scaffolds cross-linked by NHS during: a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h.



RYS. 2. Obraz SEM powierzchni liofilizowanych materiałów kolagenowych sieciowanych przy użyciu NHS przez: a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h.

FIG. 2. SEM images of the lyophilized collagen scaffolds surfaces cross-linked by NHS during: a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h.

Ponadto ma umożliwiać odpowiednie wnikanie komórek do całej objętości matrycy, produkcję nowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz waskularyzację. Obrazy SEM (RYS. 1) przedstawiają porowatą strukturę materiałów kolagenowych.

Otrzymane matryce kolagenowe posiadają niejednorodne pory. Analiza obrazów dowodzi, iż ich wielkość różni się dla próbek kolagenowych sieciowanych NHS przez 2, 8 oraz 24 h. Średnie pole powierzchni porów dla materiałów sieciowanych przez 2, 8 i 24 godziny wynosił odpowiednio 0,0572 mm², 0,0510 mm² i 0,0474 mm² (TABELA 1). Zgodnie z oczekiwaniami, wydłużenie czasu sieciowania spowodowało zmniejszenie średnich rozmiarów porów.

Warto jednak zauważyć, że liofilizowane materiały kolagenowe wykazują dwa różne rodzaje struktur. Wewnętrzna część jest porowata, podczas gdy zewnętrzna warstwa próbek stanowi rodzaj zamkniętej struktury, pozbawionej porów (RYS. 2). Na powierzchni materiałów obecne są liczne podłużne, wypukłe defekty, których liczba maleje wraz z wydłużeniem czasu sieciowania próbki.

Proces sieciowania wpływa także na podatność matrycy kolagenowych na degradację *in vitro*. Wartości ubytków masy podczas degradacji materiałów białkowych sieciowanych przy użyciu NHS przedstawione są na RYS. 3.

TABELA 1. Średnie rozmiary porów w liofilizowanym materiale kolagenowym sieciowanym przy użyciu NHS.

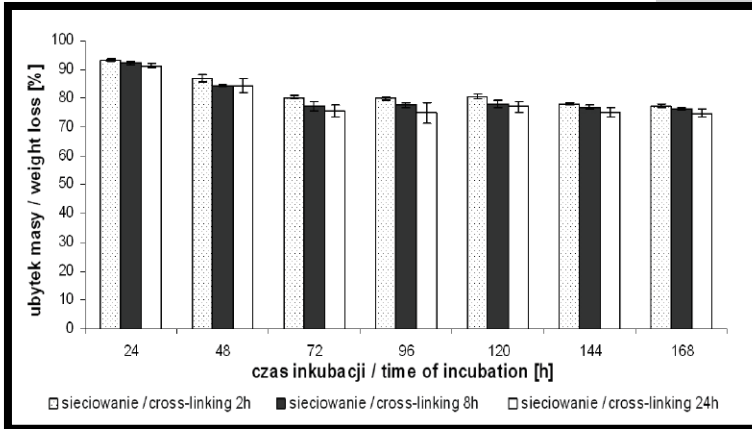
TABLE 1. Average size of pores of lyophilized collagen materials cross-linked by NHS.

	Sieciovanie NHS przez 2 h NHS cross-linking 2 h	Sieciovanie NHS przez 8 h NHS cross-linking 8 h	Sieciovanie NHS przez 24 h NHS cross-linking 24 h
Pole powierzchni porów Pore sizes [mm ²]	0.0572 ±0.0323	0.0510 ±0.0248	0.0474 ±0.0179

The collagen scaffolds possess heterogeneous pores. However, the porosity is different for materials cross-linked during various time periods. Average pore sizes for materials cross-linked NHS during 2, 8 and 24 hours were respectively 0.0572 mm², 0.0510 mm² and 0.0474 mm² (TABLE 1). As it was expected, a longer cross-linking time causes a decrease of the average value of the porous area.

It is worth noticing that the lyophilized collagen materials show two different kinds of the structure. The inner parts are porous, while the outer layers feature a kind of closed shell without pores (FIG. 2). The surfaces of the materials are covered by numerous longitudinal defects, however the number of defects decrease after longer time of cross-linking.

The cross-linking process also affects the susceptibility to degradation of the collagen materials. The values of weight loss during *in vitro* degradation analysis of collagen materials cross-linked by NHS are presented in FIG. 3.



RYS. 3. Wartości ubytków masy podczas analizy degradacji in vitro dla materiałów kolagenowych.

FIG. 3. The values of weight loss during in vitro degradation analysis of collagen materials.

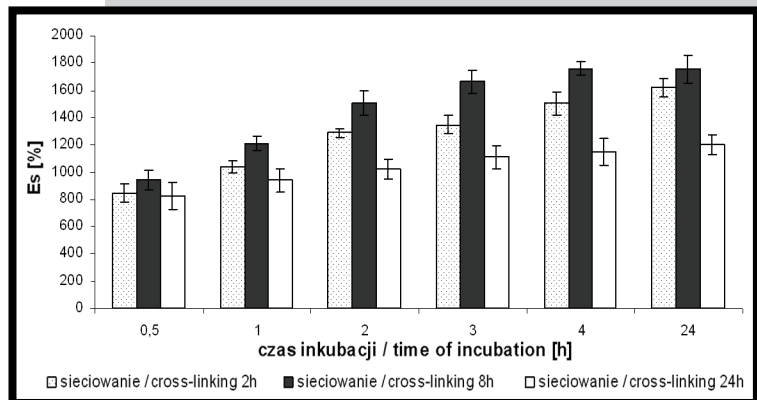
Jak można zauważyć, początkowo proces degradacji przebiega dość szybko. Po 72 godzinach inkubacji w roztworze PBS wszystkie próbki utraciły powyżej 20% początkowej masy. Jednak po tym czasie tempo degradacji znacząco spadło, a masa próbek uległa stopniowej stabilizacji. Uwagę zwraca fakt, iż wraz z wydłużeniem czasu sieciowania materiału ubytek masy nieznacznie rośnie. Obecnie rozważanych jest kilka hipotez dotyczących mechanizmu sieciowania przy użyciu NHS. Zwykle przyjmuje się, że N-hydroksymid kwasu bursztynowego najchętniej reaguje z pierwszorzędowymi aminami. Pojawiają się jednak doniesienia mówiące także o reakcji NHS z aminokwasami zawierającymi ugrupowania hydroksylowe. W efekcie pierwszej reakcji tworzone są wiązania amidowe, natomiast druga, jak sugerują niektórzy autorzy, może prowadzić także do powstawania wiązań estrowych, które nawet w łagodnych warunkach ulegają hydrolizie [9].

Na RYS. 4 przedstawiono wartości stopnia spęcznienia zanotowane dla matryc kolagenowych w buforze PBS. Zaobserwowano, że wartości stopnia spęcznienia są zbliżone dla próbek sieciowanych przez 2 i 8 godzin, natomiast spęcznienie skafoldu sieciowanego przez dłuższy czas jest ograniczone.

Wbrew oczekiwaniom, wartość naprężenia zrywającego badanych materiałów maleje wraz z wydłużeniem czasu sieciowania (RYS. 5). Podczas procesu neutralizacji łańcuchy kolagenu ulegają pewnemu uporządkowaniu. Tworzenie nowych wiązań sieciujących może zakłócać tę strukturę, a także ogranicza mobilność makrocząstek. To powoduje sztywnienie materiału oraz wzrost kruchości. Próbki mogą się stawać heterogeniczne na poziomie cząsteczkowym, co prowadzi do lokalnych koncentracji naprężeń podczas rozciągania. W rezultacie wytrzymałość materiału maleje. Może być to także efekt zmniejszenia średnich rozmiarów porów wraz z wydłużeniem czasu sieciowania, a przez to ograniczenia transportu wody do wnętrza materiału. Wiadomo, że materiały białkowe bardzo często są kruche w stanie suchym i znacznie bardziej elastyczne gdy są mokre. Wszystkie próbki przed pomiarem umieszczane były na 15 min w roztworze PBS i ulegały lekkemu spęcznieniu. Ponieważ cząsteczki wody odgrywają rolę plastyfikującą dla materiałów białkowych, w związku z tym obniżenie zawartości wody w matrycy mogło skutkować pogorszeniem parametrów wytrzymałościowych. Także wartość względnego wydłużenia przy zerwaniu uległa zmniejszeniu po dłuższych czasach sieciowania kolagenu (RYS. 6).

As one can see the degradation process at the beginning was very fast. Within 72 hours of incubation all samples have lost more than 20% of their initial weight. After this time the degradation rate significantly decreased. The weight loss slightly increases with the longer time of immersing by NHS solution. Nowadays several hypothesis concerning the mechanism of protein cross-linking by NHS are considered. NHS is the most often described as reactive towards primary amines, but also reactions with hydroxyl-containing amino acids have been reported. During these reactions the amide bonds are mainly created, but some authors suggest the formation of ester bonds, which can be hydrolysed in mild conditions [9].

FIG. 4 shows the swelling ratio of collagen materials in PBS buffer. It was observed that the swelling ratio was similar for materials cross-linked using NHS over 2 and 8 hours, whereas the swelling of collagen cross-linked over a longer time was reduced.

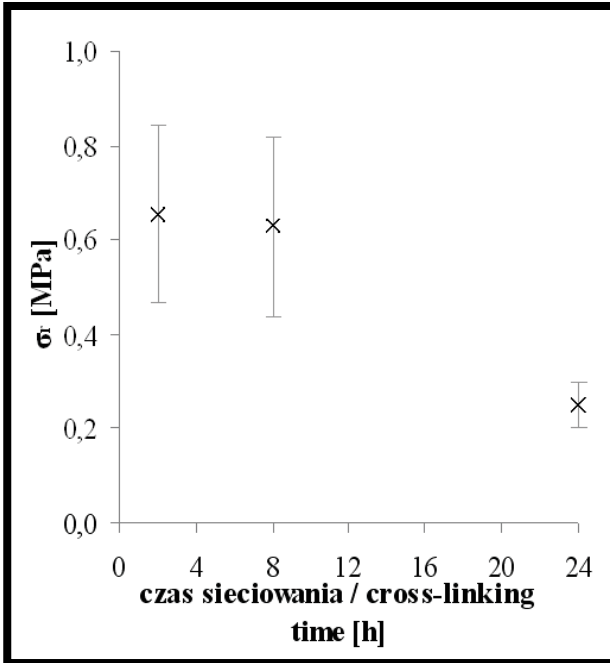


RYS. 4. Stopień spęcznienia materiałów kolagenowych w buforze PBS.

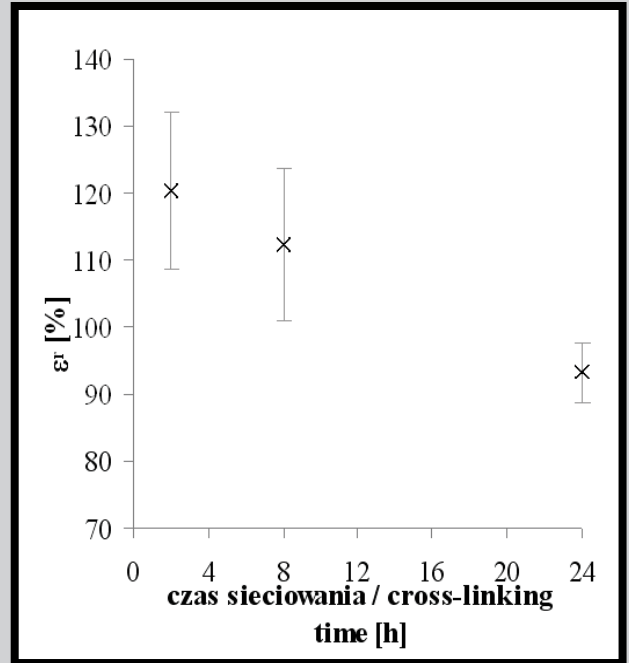
FIG. 4. The swelling ratio (E_s) of collagen materials in PBS buffer.

Surprisingly, the tensile strength of the materials decreases with a longer cross-linking time (FIG. 5). During neutralization process the collagen chains undergo arranging. The creation of the new cross-linking bonds may disrupt the structure and also the macromolecules mobility is limited. This causes greater stiffness, heterogeneity of the material and local stress concentration during stretching. As an effect the mechanical parameters are reduced. This effect may be also due to a decrease of the pore size after longer cross-linking time and a limitation of water molecule transport. It is well known, that protein materials very often are fragile in a dry state and much more elastic when they are wet. All samples, before testing, were placed for 15 min in a PBS buffer whilst they were slightly swollen. Water molecules play the role of plasticizer in protein materials and their lower content in the structure results in weaker mechanical resistance. Also the ultimate percentage elongation at breaking point declines after a longer cross-linking time (FIG. 6.)

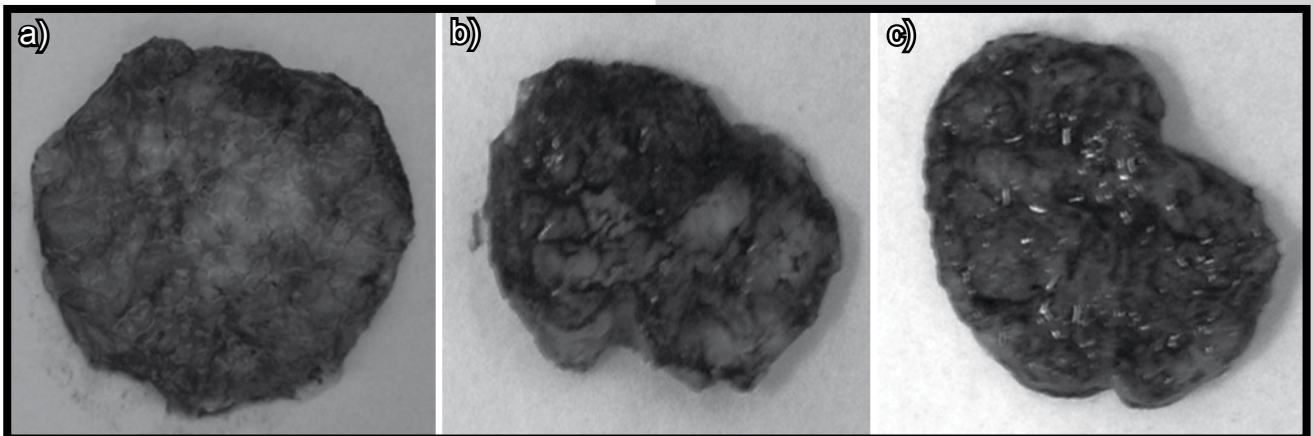
In FIG. 7, images of collagen materials after in vitro testing are presented. MTT analysis showed that all samples were well tolerated by the cells. The qualitative analysis of color intensity resulting from MTT assay, led to the conclusion that the collagen material cross-linked by NHS for 24 hours demonstrates the best properties as a surface for cell growth. It is worth noticing, that the cells were distributed on the surface of the material, but did not migrate into the inner layer of the scaffolds. This is probably caused by the lack of open pores on the surface, as it was seen on SEM images of collagen samples.



RYS. 5. Wartości naprężenia zrywającego (σ) dla materiałów kolagenowych sieciowanych NHS.
FIG. 5. The values of ultimate tensile strength at breaking point (σ) of collagen materials cross-linked by NHS.



RYS. 6. Wydłużenie względne przy zerwaniu (ϵ) próbek kolagenowych.
FIG. 6. The ultimate percentage elongation at breaking point (ϵ) of collagen materials.



RYS. 7. Fotografie materiałów kolagenowych sieciowanych przy użyciu NHS przez a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h po teście in vitro i analizie MTT.
FIG. 7. Photographs of the collagen scaffolds cross-linked by NHS during: a) 2 h, b) 8 h, c) 24 h after in vitro test and MTT assay.

Na RYS. 7 przedstawiono zdjęcia materiałów kolagenowych po przeprowadzonym teście hodowli komórkowej in vitro. Test MTT wykazał, że wszystkie materiały są dobrze tolerowane przez komórki. Jakościowa analiza intensywności koloru wynikającego z przeprowadzonego testu MTT pozwala stwierdzić, że najlepszą powierzchnią dla wzrostu komórek charakteryzuje się materiał kolagenowy sieciowany NHS przez 24 godziny. Należy jednak zauważyć, że komórki rozmieszczone były równomiernie na powierzchni materiału, lecz nie zaobserwowano ich w głębi. Brak migracji komórek oraz medium do wnętrza skafoldu wynika najprawdopodobniej z braku występowania otwartych porów w warstwie wierzchniej materiału. Potwierdzają to zdjęcia SEM powierzchni próbek kolagenowych.

Conclusions

Our method allows to obtain porous, three-dimensional collagen scaffolds. The cross-linking of the materials by N-hydroxysuccinimide influences their properties. The average pore size, swelling degree and surprisingly, mechanical properties decrease with a longer cross-linking time. Also the resistance to in vitro degradation slightly decreases with the longer time of immersing by NHS solution. All samples are well tolerated by the cells. It is worth noticing that the surface material was closed, without pores and cells could not migrate into the structure of the scaffolds. However, we suppose that this technique may be used to close cells during preparation into the scaffold and protect them from the environment in the initial period after implantation.

Wnioski

Zastosowana metoda pozwoliła otrzymać porowate, trójwymiarowe matryce kolagenowe. Sieciowanie przy użyciu N-hydroksymidru kwasu bursztynowego wpływa na właściwości tych materiałów. Średni rozmiar porów, stopień spęczenia oraz, co zaskakujące, także wytrzymałość na zerwanie maleją wraz z wydłużeniem czasu sieciowania. Także odporność na degradację *in vitro* maleje po dłuższym sieciowaniu. Wszystkie próbki były dobrze tolerowane przez fibroblasty mysie 3T3. Na uwagę zasługuje fakt, że powierzchnia materiału była zamknięta, pozbawiona porów, co uniemożliwiło komórkom wnikanie do wnętrza skafoldu. Z drugiej jednak strony, wydaje się, że zastosowana metoda otrzymywania materiałów kolagenowych może pozwolić na zamknięcie komórek w ich wnętrzu i zabezpieczyć przed wpływem środowiska w pierwszym okresie po implantacji.

Podziękowania

Badania były współfinansowane z grantu Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika z dotacji statutowej dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktorskich SDCh: Ch1105.

Acknowledgments

This work was supported in part by the grant of Faculty of Chemistry Nicolaus Copernicus University Ch1105.

Piśmiennictwo

- [1] Shoichet M.S.: Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules* 43 (2010) 581-591.
- [2] Tangsadthakun Ch., Kanokpanont S., Sanchavanakit N., Banaprasert T., Damrongsakkul S.: Properties of collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 16 (2006) 37-44.
- [3] Yunoki S., Mori K., Suzuki T., Nagai N., Munekata M.: Novel elastic material from collagen for tissue engineering. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 18 (2007) 1369-1375.
- [4] Ramshaw J.A.M., Peng Y.Y., Glattauer V., Werkmeister J.A.: Collagens as biomaterials. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 20 (2009) S3-S8.
- [5] Potorac S., Popa M., Maier V., Lisa G., Verestiuc L.: New hydrogels based on maleilated collagen with potential applications in tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 32 (2012) 236-243.

References

- [6] Srinivasan A., Punnoose A. M., Nagarajan N., Kuruvilla S., Sehgal P.K., Balakrishnan K.: Collagen 3 D fleece as scaffold for cardiac tissue engineering. *Indian Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery* 28 (2012) 1-5.
- [7] Skopińska-Wiśniewska J., Sionkowska A., Kamińska A., Kaźnica A., Joachimiak R., Drewa T.: Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration. *Applied Surface Science* 255 (2009) 8286-8292.
- [8] Harouna A.A., Migonneyb V.: Synthesis and *in vitro* evaluation of gelatin/hydroxyapatite graft copolymers to form bionanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules* 46 (2010) 310-316.
- [9] Madler S., Bich C., Touboul D., Zenobi R.: Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. *Journal of Mass Spectrometry* 44 (2009) 694-706.