

WPLÝW CYKLICZNEGO ZAMRAŻANIA I ROZMRAŻANIA NA WŁAŚCIWOŚCI MATERIAŁÓW KOLAGENOWYCH

J.SKOPINSKA-WISNIEWSKA*, A.SIONKOWSKA, A.BAJEK, A.BACZIS-MACIKOWSKA

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA, WYDZIAŁ CHEMII,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA,
*E-MAIL: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 122-123, (2013), 43-45]

Wstęp

Inżynieria tkankowa to dynamicznie rozwijająca się gałąź medycyny regeneracyjnej. Wykorzystuje ona różnego rodzaju materiały polimerowe jako rusztowania do hodowli komórek. Materiały te muszą sprostać szczególnym wymaganiom stawianym przez inżynierię tkankową. Od rusztowań dla hodowli tkankowych oczekuje się by były biokompatybilne i posiadały odpowiednie właściwości mechaniczne. Materiały te muszą być nietoksyczne i z upływem czasu ulegać degradacji z wytworzeniem bezpiecznych, łatwych do usunięcia z organizmu produktów. Materiały te muszą także wykazywać odpowiednią porowatość konieczną dla umożliwienia migracji komórkom oraz transportu gazów, substancji odżywczych, metabolitów i czynników wzrostu. Powinny zapewniać warunki do proliferacji i różnicowania komórek, a w efekcie do produkcji nowej macierzy zewnątrzkomórkowej. Stąd też, uwaga wielu badaczy skupia się na uzyskaniu odpowiednich porowatych biomateriałów lub hydrożeli. Obecnie stosowanych jest wiele metod pozwalających na uzyskanie materiałów tego typu, m.in. liofilizacja, sporządzanie materiałów zawierających sól jako porogenu, czy technika wykorzystująca żelowanie roztworów polimerowych w temperaturze poniżej zera [1]. Kryształy zamrożonego rozpuszczalnika występują wówczas w roli czynnika porotwórczego. Po rozmrożeniu powstają puste przestrzenie tworzące system połączonych porów [2]. Metoda ta jest wykorzystywana do otrzymywania hydrożeli dla inżynierii tkankowej opartych np. na poli(alkoholu winylowym) i żelatynie [3-5].

Kolagen to jeden ze składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Jest biokompatybilny, nietoksyczny, nieantygenny, biodegradowalny, wspiera adhezję i proliferację komórek. Właściwości te sprawiły, że kolagen jest jednym z najczęściej stosowanych materiałów w inżynierii tkankowej. Białko to posiada znakomite właściwości mechaniczne w stanie natywnym, jednak podczas izolacji z tkanek traci je na skutek niszczenia struktury. Jednakże, jego znakomite właściwości biologiczne pozostają niezmiennione. Obecnie testuje się różne metody modyfikacji kolagenu. W celu poprawy parametrów mechanicznych najczęściej stosuje się sieciowanie chemiczne. Należy jednak pamiętać, że nawet niewielki dodatek kolejnych reagentów może niekorzystnie wpływać na właściwości biologiczne materiału.

Z tego względu celem pracy było zbadanie wpływu cyklicznego zamrażania i rozmrażania na właściwości powstającego żelu kolagenowego.

FREEZE-THAWING PROCESSING OF COLLAGEN

J.SKOPINSKA-WISNIEWSKA*, A.SIONKOWSKA, A.BAJEK, A.BACZIS-MACIKOWSKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY,
7 GAGARIN STR., 87-100 TORUŃ, POLAND
*E-MAIL: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[Engineering of Biomaterials, 122-123, (2013), 43-45]

Introduction

Tissue engineering is a rapidly growing field of regenerative medicine. It employs a number of polymeric materials as a support for cell cultures. The materials applied for tissue engineering have to meet some specified requirements. The scaffolds should be biocompatible and possess appropriate mechanical properties. The materials must be non-toxic and, over the time, the scaffolds should degrade into safe components which can be easily eliminated from the body. The highly porous three-dimensional structure is also necessary in order to provide sufficient space and surface for cell seeding. The interconnected pores permit transport of gases, nutrients, and regulatory factors to allow cell survival, proliferation, differentiation and finally ECM fabrication. So, the attention of several groups of researchers is focused on developing of porous biomaterials and hydrogels, which are highly swollen polymer networks. Nowadays, some methods of fabrication of this kind of scaffolds are achieved, e.g. freeze-drying and salt leaching [1]. The scaffold can be also synthesized via cryogelation technology which involves the sub-zero incubation of polymer solutions. The crystals of frozen solvent occur as a pore-forming agents. After melting they leave voids and the system of interconnected pores is created inside the gel [2]. This method is applied for the preparation of gels for tissue engineering based on e.g. poly(vinyl alcohol) and gelatin [3-5].

Collagen is a component of extracellular matrix. It is biocompatible, non-toxic, non-antigenic, biodegradable and promotes cell adhesion and proliferation. This makes the collagen as a one of the most commonly used material in tissue engineering. It possess very attractive mechanical properties in native state but during isolation from tissues its unique structure is destroyed what significantly affects the strength of the materials. However, it still has an excellent biological properties. Currently, the various methods of modifications of the collagen are tested. Especially chemical cross-linking is the widely used method of improving mechanical parameters of collagen. However, it has to be noticed, that addition of chemicals can affect the biological properties of the material.

Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of freezing and thawing on the properties of collagen gel.

Z kolagenu wyizolowanego ze ścięgien ogonowych młodych szczurów albinosów sporządzono roztwór w 0,1 M kwasie octowym [6]. Roztwór poddano dializie w tubach dializacyjnych względem wody dejonizowanej. Następnie kolagen poddano zamrażaniu w temp. -20°C oraz rozmrażaniu w temp. pokojowej. Zastosowano jeden i pięć cykli zamrażania-rozmrażania.

Wyniki i dyskusja

Cykliczne zamrażanie i rozmrażanie jest z powodzeniem stosowane do otrzymywania stabilnych, sztywnych żeli żelatynowych. Z tego względu zdecydowano o wykorzystaniu tej metody do uzyskania żeli na bazie niedenaturowanego kolagenu. Żele kolagenowe zamrażano w postaci cylindrów o średnicy 16 mm i wysokości 10 mm. Zaobserwowano jednak, że podczas rozmrażania żele traciły znaczną ilość wody, a ich kształt ulegał zmianie. Z tego względu, końcowe rozmrażanie prowadzono w wodzie. Żele, które pięciokrotnie poddawano zamrażaniu i rozmrażaniu wydawały się znacznie sztywniejsze niż żele zamrażane jeden raz. Jednak testy mechaniczne wykazały, że moduł ściskania maleje wraz ze zwiększeniem liczby cykli zamrażania i rozmrażania (TABELA 1.).

TABELA 1. Wartości modułu ściskania żeli kolagenowych niemrożonych oraz poddanych 1 i 5 cyklom mrożenia i rozmrażania.

TABLE 1. The values of compression modulus of collagen materials non-frozen and freeze-thawed 1 and 5 times.

Próbka Specimen	E_{mod}
collagen	0,821
collagen freezed 1x	0,609
collagen freezed 5x	0,513

Także zdolność pęcznienia w roztworze buforu fosforanowego maleje wskutek zamrażania i rozmrażania materiałów kolagenowych (RYS.1.). Wszystkie próbki wykazywały znaczną absorpcję PBS w ciągu pierwszych 4 godzin inkubacji, a następnie stopień spęcznienia ulegał stabilizacji. Niemodyfikowane materiały kolagenowe wykazywały najwyższą zdolność do pęcznienia w PBS (stopień spęcznienia ok. 2000%), podczas gdy żele poddane zamrażaniu i rozmrażaniu absorbowały 1700% i 1600%. Zaobserwowano jednak, że po 24 godzinach spęczniania, wszystkie materiały charakteryzowały się podobnymi właściwościami.

Dokonano pomiaru kąta zwilżania powierzchni materiałów kolagenowych przy użyciu gliceryny i diiodometanu oraz obliczono swobodną energię powierzchniową metodą Owensa-Wendta. Wyniki przedstawiono w TABELI 2. Najniższą wartość swobodnej energii powierzchniowej zaobserwowano dla niemodyfikowanego materiału kolagenowego. Po 1 i 5 cyklach mrożenia-rozmrażania wartość tego parametru wzrosła. Uzyskane wyniki wskazują także na zwiększenie polarności badanych powierzchni na skutek zamrażania. Zmiany te mogą prowadzić do poprawienia adhezji komórek do powierzchni materiału.

Materials and methods

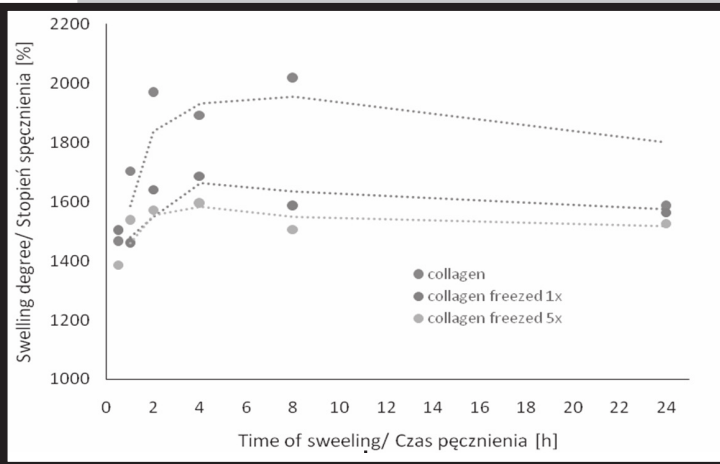
The solution of collagen from tail tendons of young albino rats in 0,1 M acetic acid was obtained in our laboratory [6]. This solution was poured into dialysis bag and neutralized during dialysis process against deionised water. The collagen was frozen at -20°C for 12h and then allowed to thaw at room temperature. One and five freezing-thawing cycles were performed for the samples of collagen.

Results and discussion

The freeze-thawing process is successfully used for the preparation of stable, stiff gelatin gels. So, we decided to employ this method to obtain gels based on non-denatured collagen. The collagen gels were frozen in a form of completely swollen cylinders with diameter of 16 mm and height 10 mm. However, during thawing, the gels have lost a significant amount of water and they shapes were changed. For this reason, the final thawing was carried out in water. The gels, which were frozen and thawed five times seemed stiffer than the frozen one time. But the mechanical tests showed that the compression modulus decrease with increasing number of cycles of freezing and thawing (TABLE 1.).

Also, the swelling ability in the PBS buffer decreased after freezing and thawing of the collagen materials (FIG.1). All the samples swelled dynamically during the first 4 hours and then followed by stabilization of swelling degree. The unfrozen material exhibited the highest swelling degree of PBS (approx. 2000%), while the frozen materials absorbed about 1700% and 1600%. However, after 24h of incubation in PBS buffer all the samples showed similar properties.

The contact angle measurements were made using the glycerol and diiodomethane, and the surface free energy was calculated by Owens-Wendt method. The results are presented in the TABLE 2. The value of surface free energy was the lowest for untreated collagen and increased after 1 and 5 freeze-thawing cycles. Moreover, the results proved that the surfaces of frozen collagen gels were more polar than of the non-modified material. This changes of the surface properties may lead to the improvement of cell adhesion ability of the material.



RYS.1. Stopień spęcznienia (E_s) materiałów kolagenowych w roztworze buforu fosforanowego.

FIG.1. The swelling degree (E_s) of collagen materials in PBS buffer.

TABELA 2. Wartości swobodnej energii powierzchniowej oraz jej składowej polarnej dla żeli kolagenowych niemrożonych oraz poddanych 1 i 5 cyklom mrożenia i rozmrażania.

TABLE 2. The surface free energy (IFT (s)) and its polar component (IFT (s,P)) of collagen materials non-frozen and freeze-thawed 1 and 5 times.

Próbka Specimen	IFT(s)	IFT(s,P)
collagen	21,25	10,19
collagen freezed 1x	25,12	20,2
collagen fereezed 5x	26,45	17,9

Wnioski

Badania wykazały, że właściwości materiałów kolagenowych poddanych cyklicznemu zamrażaniu i rozmrażaniu uległy znaczącej zmianie. Właściwości mechaniczne oraz zdolność pęcznienia żeli uległy pogorszeniu po modyfikacji podczas gdy polarność ich powierzchni wzrosła. Należy jednak stwierdzić, że w przypadku kolagenu metoda polegająca na cyklicznym zamrażaniu i rozmrażaniu materiału nie daje tak dobrych rezultatów jak w przypadku żelatyny

Podziękowania

Przeprowadzone badania były finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki (NCN, Poland, Grant no: UMO-2011/03/D/ST8/04600).

Conclusions

The our study showed that the properties of collagen gels were changing after freeze-thawing process. The mechanical properties and swelling ability were deteriorated, while the polarity of the surface increase after modification. However, it should be noted that, in the case of collagen this method does not give as good results as in the case of gelatin.

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Science Centre (NCN, Poland, Grant no: UMO-2011/03/D/ST8/04600) for providing financial support to this project.

Piśmiennictwo

- [1] H.-W. Kang, Y. Tabata, Y. Ikada, Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 20 (1999) 1339-1344
- [2] V.I. Lozinsky, I.Y. Galaev, F.M. Plieva, I.N. Savina, H.Jungvid, B. Mattiasson, Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends in Biotechnology* 21 (2003) 445-451
- [3] M. Lee, H. Bae, S. Lee, N. Chung, H. Lee, S. Choi, S. Hwang, J. Lee, Freezing/thawing processing of PVA in the preparation of structured microspheres for protein drug delivery, *Macromolecular Research* 19 (2011) 130-136

References

- [4] I. Inci, H. Kirsebom, I.Y. Galev, B. Mattiasson, E. Piskin, Gelatin cryogels crosslinked with oxidized dextran and containing freshly formed hydroxyapatite as potential bone tissue-engineering scaffolds, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 7 (2013) 584-588
- [5] N.E. Vrana, P.A. Cahill, G.B. McGuinness, Endothelialization of PVA/gelatin cryogels for vascular tissueengineering: Effect of disturbed shear stress conditions, *Journal of Biomedical Materials Research A* 94 (2010) 1080-1090
- [6] J. Skopińska-Wiśniewska, A. Sionkowska, A. Kamińska, A. Kaźnica, R. Joachimiak, T. Drewna, Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration, *Applied Surface Science*, 2009, 255, 8286-8292