

OTRZYMYWANIE ORAZ CHARAKTERYSTYKA SKAFOLDÓW SIECIOWANYCH KWASEM TANINOWYM NA BAZIE CHITOZANU, KOLAGENU ORAZ KWASU HIALURONOWEGO

BEATA KACZMAREK*, ALINA SIONKOWSKA,
EWELINA MARKIEWICZ, AGATA KOŁODZIEJCZAK

KATEDRA CHEMII BIOMATERIAŁÓW I KOSMETYKÓW,
WYDZIAŁ CHEMII, UNIwersYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ

*E-MAIL: BEATAKACZMAREK8@GMAIL.COM

Streszczenie

Biopolimery są szeroko stosowane w dziedzinie biomateriałów. Są biokompatybilne, biodegradowalne oraz nietoksyczne dla ludzkiego organizmu. Celem niniejszych badań eksperymentalnych było otrzymanie kompozytów na bazie kolagenu, chitozanu oraz kwasu hialuronowego modyfikowanych poprzez dodatek kwasu taninowego. Biopolimery zostały wymieszane poprzez sporządzenie 1% roztworów każdego z nich, przy czym kolagen oraz chitosan były wymieszane w stosunku wagowym 50/50 oraz do tej mieszaniny zastosowano 1, 2 i 5 (w/w%) dodatek kwasu hialuronowego. Do mieszaniny dodano następnie 2, 5, 10 oraz 20 (w/w%) kwasu taninowego oraz otrzymano skafoldy metodą suszenia sublimacyjnego. Próbkę zarówno z dodatkiem kwasu taninowego jak i bez niego zostały scharakteryzowane poprzez pomiar ich właściwości mechanicznych, analizę spektroskopii w podczerwieni (IR-ATR) oraz obrazowanie przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Ponadto wyznaczono porowatość oraz gęstość każdego ze skafoldów. Wszystkie otrzymane próbki były porowate i nie zaobserwowano znaczących różnic w strukturze na zdjęciach SEM. Na widmach IR-ATR charakterystyczne piki polimerów takie jak: amidowe I, II, III oraz A były przesunięte po dodatku taniny w wyniku pojawienia się wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych. Wyniki pokazują, że kwas taninowy może być wykorzystany jako czynnik sieciujący stosowany w celu modyfikacji właściwości biomateriałów.

Słowa kluczowe: kolagen, chitosan, kwas hialuronowy, sieciowanie, kwas taninowy

[*Inżynieria Biomateriałów 136 (2016) 21-27*]

Wprowadzenie

Kolagen, chitosan oraz kwas hialuronowy zaliczane są do grupy biopolimerów. Kwas hialuronowy jest anionowym polimerem, jego duże ilości można znaleźć w macierzy zewnątrzkomórkowej i płynach maziowych. Kwas ten może być produkowany przez mikroorganizmy (na przykład szczepy paciorkowców) oraz z materiałów pochodzenia zwierzęcego (na przykład ciało szkliste, grzebienie kogucie, ludzka pępowa). Jego właściwości różnią się w zależności od jego masy cząsteczkowej. Przykładowo, wysokocząsteczkowy kwas hialuronowy pełni funkcję przeciwzapalną, a temu o niskiej masie przypisuje się cechy czynnika pro-zapalnego [1-3].

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF TANNIC ACID CROSS-LINKED SCAFFOLDS MADE OF CHITOSAN, COLLAGEN AND HYALURONIC ACID

BEATA KACZMAREK*, ALINA SIONKOWSKA,
EWELINA MARKIEWICZ, AGATA KOŁODZIEJCZAK

DEPARTMENT OF CHEMISTRY OF BIOMATERIALS AND COSMETICS,
FACULTY OF CHEMISTRY, NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUN, POLAND

*E-MAIL: BEATAKACZMAREK8@GMAIL.COM

Abstract

Biopolymers are widely used in biomaterials science. They are biocompatible, biodegradable and non-toxic for human body. The aim of the study was to obtain scaffolds made of chitosan, collagen and hyaluronic acid modified by addition of tannic acid. The biopolymers were mixed as 1% solution, where collagen and chitosan were mixed in 50/50 (w/w%) and 1, 2 and 5 (w/w%) of hyaluronic acid was added. 2, 5, 10 and 20 (w/w%) of tannic acid was added to the mixture and scaffolds were obtained by freeze drying method. Samples with the tannic acid as well as without it were characterized by the mechanical parameters measurement, infrared spectroscopy (IR-ATR) and scanning electron microscopy (SEM). Moreover the porosity and density of the scaffolds were determined. The addition of tannic acid improves the mechanical properties and porosity of the scaffolds. All the scaffolds were porous and no significant changes in the structure were observed at the SEM images. In the IR-ATR spectra characteristic peaks of polymers as amide I, II, III and A were shifted after addition of tannic acid due to the presence of new hydrogen bonds and electrostatic interactions. The results show that tannic acid can be used as a cross-linking agent to modify the properties of the scaffolds.

Keywords: collagen, chitosan, hyaluronic acid, cross-linking, tannic acid

[*Engineering of Biomaterials 136 (2016) 21-27*]

Introduction

Collagen, chitosan and hyaluronic acid belong to the group of biopolymers. Hyaluronic acid is anionic polymer; its large amounts can be found in extracellular matrix and synovial fluids. It can be produced by microorganisms (for example pneumococcal strains) or isolated from natural sources (for example from vitreous, rooster combs, human umbilical cord). Its properties depend on the molecular weight. High molecular weight hyaluronic acid has anti-inflammatory function; however, this one with low molecular weight is a pro-inflammatory factor [1-3]. Collagen is the main protein in the mammals' body. Nowadays there are 29 types of collagen. It has a triple, right-twisted helix constructed by three left-handed amino acid chains. Main amino acids present in collagen structure form sequence of GLY-X-Y (GLY-glycine) where X and Y are proline and hydroxyproline.

Kolagen to jedno z najczęściej występujących białek w organizmie ssaków. Wyróżnia się 29 typów kolagenu. Białko to ma budowę potrójnej, skręconej prawoskrętnie, helisy, utworzonej z trzech lewoskrętnych łańcuchów sekwencji aminokwasowych. W strukturze kolagenu wyróżnia się sekwencję aminokwasów GLY-X-Y (GLY-glicyna), gdzie X i Y to zwykle prolina i hydroksyprolina. W organizmach zwierzęcych kolagen przyspiesza gojenie się ran, konieczny jest do tworzenia i regeneracji naczyń krwionośnych, tkanki łącznej oraz wspomaga układ kostny [4-6]. Chitozan jest rozpuszczalnym w wodzie polimerem kationowym. Powstaje w wyniku deacetylacji chityny, przy czym aby powstał chitozan konieczne jest osiągnięcie 50% stopnia deacetylacji. Charakteryzuje się dobrą biogodnością, biodegradowalnością oraz właściwościami nawilżającymi, grzybobójczymi i antybakteryjnymi. Znalazł zastosowanie w medycynie oraz przemyśle kosmetycznym. Ze względu na możliwości adsorbujące włókna chitozanu można stosować w oczyszczalniach ścieków. Ponadto chitozan znalazł zastosowanie w szeregu branż, takich jak: spożywcza, tekstylna, papiernicza, fotograficzna, chemiczna [7-10].

Biopolimerom przepisuje się szereg cech, dzięki którym znalazły one zastosowanie w medycynie. Przede wszystkim istotna jest ich biokompatybilność, ale ceni się je również za łatwość modyfikacji i ponownego przetwarzania oraz odpowiednią cenę. Można je używać do produkcji materiałów stosowanych w dentystyce, implantologii, opatrunkach, protezach, w przemyśle farmaceutycznym, inżynierii tkankowej [11]. Tak szerokie zastosowanie powoduje, że są one częstym przedmiotem badań nad ich właściwościami i możliwościami modyfikacji.

Aby móc modyfikować biopolimery często stosuje się sieciowanie. Proces ten prowadzi do nadania nowych właściwości chemicznych oraz fizycznych. Wyróżnia się sieciowanie fizyczne, chemiczne i enzymatyczne. W przypadku fizycznego sieciowania wykorzystuje się wpływ temperatury oraz promieniowania (UV, gamma). Podczas sieciowania chemicznego zachodzi reakcja między polimerem a czynnikiem sieciującym [12-14].

W naszej pracy zaproponowano chemiczne sieciowanie mieszaniny wyżej wymienionych biopolimerów, takich jak kolagen, chitozan oraz kwas hialuronowy, za pomocą kwasu taninowego. Kwas ten zbudowany jest z glukozy i cząsteczek kwasu galusowego. Stosuje się go jako czynnik sieciujący w biomateriałach [15].

Materiały i metody

Kolagen został wyizolowany w laboratorium ze ścięgien szczurzych ogonów. Chitozan ($M_v = 5.4 \cdot 10^5$ g/mol; DD = 77%) został zakupiony w firmie Fluka oraz kwas hialuronowy (HA), jak i kwas taninowy (TA) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich. Chitozan oraz kolagen (jako 1% roztwory w 0,1 M kwasie octowym) zostały zmieszane w stosunku masowym 50/50. HA (jako 1% roztwór w 0,1 M kwasie chlorowodorowym) został dodany w ilości 1, 2 oraz 5% wag. Kwas taninowy w postaci proszku został dodany do mieszaniny polimerów w ilości 2, 5, 10 oraz 20 % wag. jako czynnik sieciujący. Roztwory zostały umieszczone w polistyrenowych płytkach i zamrożone w temperaturze -80°C . Następnie zamrożone mieszaniny zostały poddane liofilizacji w temperaturze -55°C oraz pod ciśnieniem 5 Pa przez 48 h (ALPHA 1-2LD plus, CHRIST, Niemcy). Próbki mieszaniny chitozanu oraz kolagenu zostały pozostawione jako próby kontrolne.

In animal bodies collagen enhances the healing of wounds, creation and regeneration of vessels, connective tissue and it supports the skeletal system [4-6]. Chitosan is soluble in water cationic polymer. It is obtained in deacetylation process from chitin, where it is necessary to obtain at least 50% of deacetylation degree. It is biocompatible, biodegradable and has moisturizing properties as well as antifungal and antibacterial ones. Chitosan found application in medicine and cosmetic industry. Moreover it is used in food, chemical, paper, photographic industry [7-10].

Biopolymers have many properties, which are relevant for their use in medicine. The main aspect is their biocompatibility, but also the easy way to modify their properties, possibility to recycle and reasonable price. Natural polymers can be used to produce materials for dental application, as dressing, dentures and tissue engineering [11]. Such wide application results that biopolymers are in a great interest for the research of their properties and new potential possibilities of modification.

Biopolymers can be modified by the cross-linking process. It can lead to new chemical and physical properties. Cross-linking process can be chemical, physical and enzymatic one. In the case of physical cross-linking process the temperature and radiation (UV or gamma) are used. During the chemical cross-linking the chemical reaction takes place between polymer and cross-linking agent [12-14].

The aim of this study was chemical cross-linking of triple components blend of biopolymers (collagen, chitosan and hyaluronic acid) by tannic acid addition. Tannic acid is built of glucose and gallic acid. It can be used as cross-linking agent in biomaterials [15].

Materials and Methods

Collagen was obtained from rat tail tendons in the laboratory. Chitosan ($M_v = 5.4 \cdot 10^5$ g/mol; DD = 77%) was purchased from Fluka and hyaluronic acid (HA) and tannic acid (TA) from Sigma-Aldrich. Chitosan and collagen (as 1% concentration in 0.1 M acetic acid) mixtures were prepared by mixing two solutions in the weight ratio 50/50. HA (as 1% concentration in 0.1 M hydrochloric acid) was added as 1, 2 and 5 w/w% addition. Tannic acid in a solid phase was added to the mixture of chitosan, collagen and hyaluronic acid as 2, 5, 10 and 20 w/w% addition as a cross-linking agent. Solutions were mixed and put into the polystyrene container and then placed in a freezer at -80°C . Frozen mixtures were lyophilized at -55°C and 5 Pa for 48 h (ALPHA 1-2LD plus, CHRIST, Germany). Chitosan/collagen scaffolds were left as control probes.

Spectra of the attenuated total reflected infrared spectroscopy were obtained. For scaffolds IR spectra were obtained using a Nicolet iS10 spectrophotometer equipped with an ATR device with diamond crystal [21]. All spectra were recorded in absorption mode at a 4 cm^{-1} interval and 64 scans.

The density and porosity of scaffolds were measured by isopropanol displacement, because it does not wet the sample [4]. Samples were put into the known volume of isopropanol. After 5 min the change in volume of isopropanol-impregnated scaffold was measured. The sample was removed from the solution and again the difference in isopropanol volume was determined. The density of the porous sample (d) was calculated:

$$d = \frac{W}{V_2 - V_3} \quad (1)$$

where: W is sample weight, V_2 is the total volume of isopropanol and isopropanol-impregnated scaffold, V_3 is the isopropanol volume after sample removing.

Spektroskopia w podczerwieni została wykorzystana do wykonania widm celem obserwacji położenia charakterystycznych pików pochodzących od grup znajdujących się w strukturze polimerów. Widma IR otrzymano wykorzystując technikę ATR z diamentem (Nicolet iS10). Wszystkie widma zostały zarejestrowane z rozdzielczością 4 cm^{-1} i liczbą 64 skanów.

Gęstość i porowatość skafoldów zostały wyznaczone poprzez zanurzenie próbek w izopropanolu, ponieważ z jego użyciem zwilżanie skafoldów nie jest obserwowane. Próbkę o znanej masie zostały umieszczone w określonej objętości izopropanolu. Po 5 min została zanotowana zmiana objętości izopropanolu, a następnie próbka została wyjęta i różnica objętości została zmierzona ponownie. Gęstość skafoldu została wyznaczona ze wzoru:

$$d = \frac{W}{V_2 - V_3} \quad (1)$$

gdzie: W to masa próbki [mg], V_2 to objętość izopropanolu razem z zanurzoną próbką, V_3 objętość izopropanolu po wyjęciu próbki. Porowatość (ϵ) została obliczona na podstawie wzoru:

$$\epsilon = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie: V_2 , V_3 to oznaczenia stosowane powyżej, V_1 to początkowa objętość izopropanolu.

Właściwości mechaniczne były mierzone przy użyciu maszyny wytrzymałościowej (Z.05, Zwick/Roell, Niemcy) dla każdego rodzaju próbki. Cylindryczne próbki o średnicy 15 mm oraz wysokości 14 mm były przygotowane do testów mechanicznych. Wszystkie pomiary były prowadzone w temperaturze oraz wilgotności pokojowej. Prędkość początkowa została ustawiona na 2 mm/min. Moduł ściskania to moduł Younga dla procesu ściskania, który określa sztywność elastycznej próbki. Jest liczony z nachylenia krzywej naprężenie-odkształcenie w liniowym obszarze (w obszarze odkształcenia od 2 do 5%). Dla każdego typu próbki wykonano minimum 10 pomiarów.

Morfologia próbek została zbadana przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) (LEO Electron Microscopy Ltd, Anglia). Skafoldy były przecięte skalpelem po zamrożeniu ich w ciekłym azocie przez 3 min. Próbkę były pokrywane złotem i obserwowana była wewnętrzna struktura kompozytu.

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzono badania właściwości mechanicznych każdej z próbek; wyznaczone parametry takie jak moduł Younga oraz siła ściskająca są przedstawione w TABELI 1.

Dodatek kwasu hialuronowego do mieszaniny chitozanu oraz kolagenu powoduje początkowo zmniejszenie modułu Younga oraz siły zrywającej (dla 1% dodatku), a następnie zwiększenie parametrów mechanicznych. Dodatek kwasu tanninowego powoduje polepszenie właściwości mechanicznych w porównaniu z materiałami nieusięciowanymi. Najwyższy moduł Younga charakteryzuje próbkę chitozanu oraz kolagenu z 5% dodatkiem kwasu hialuronowego z 20% dodatkiem kwasu tanninowego. Siła ściskająca osiąga najwyższe wartości dla próbki tego samego rodzaju, przy czym dodatek kwasu tanninowego nie powoduje znacznej zmiany wartości.

The porosity (ϵ) of the scaffold was calculated using the equation:

$$\epsilon = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \cdot 100\% \quad (2)$$

where V_2 , V_3 as above, V_1 is the initial volume of isopropanol.

Mechanical properties were measured by mechanical testing machine (Z.05, Zwick/Roell, Germany) for each kind of sample. Cylindrical samples with a diameter of 15 mm and height of 14 mm were prepared for mechanical testing. All measurements were carried out at room temperature and humidity. The cross-head speed was set at 2 mm/min. The compressive modulus is a Young's modulus for the compression process, where it determinates the stiffness of an elastic scaffold. It was calculated from the slope of the stress-strain curves in the linear region (strain from 2 to 5%). For each kind of sponge, at least ten samples were tested.

The morphology of the samples was studied using scanning electron microscope (SEM) (LEO Electron Microscopy Ltd, England). Scaffolds were cut with a razor scalpel after being frozen in liquid nitrogen for 3 min. Samples were covered with gold layer and the cross-section structure was observed.

Results and Discussions

Mechanical properties were measured for each kind of samples, mechanical parameters as Young's modulus and maximum compressive strength are shown in TABLE 1.

The addition of hyaluronic acid to the mixture of chitosan and collagen firstly decreases the Young's modulus and compressive strength (for 1% addition), and then the improvement of mechanical parameters was observed. The addition of tannic acid improves mechanical properties in comparison to materials which were not cross-linked. The highest Young's modulus characterizes the sample of chitosan and collagen with 5% addition of hyaluronic acid with 20% of tannic acid. Compressive strength has the highest values for the same kind of sample, where the addition of tannic acid does not cause any significant changes.

Infrared spectra were made to determine the localization of characteristic groups present in collagen, chitosan and hyaluronic acid structure, as well as to determine the presence of new bonds and interactions between polymers and between polymers and cross-linking agent. The spectra of chitosan, collagen and 5% hyaluronic acid with 20% (CTS/Coll/5HA+20%TA) and without tannic acid addition (CTS/Coll/5HA) are presented in FIG. 1 and all of the results of IR analysis are shown in TABLE 2.

The addition of hyaluronic acid to chitosan/collagen blend leads to the shift of characteristic bands in IR spectra. It suggests that HA interacts with collagen and chitosan, probably by the hydrogen bonds and electrostatic interactions. The localization of C-O-C groups does not change more than 4 cm^{-1} where it is the value of IR device resolution. Addition of tannic acid causes the shift of peak from Amide A and III for the mixture of chitosan and collagen, and for scaffolds with hyaluronic acid addition Amide A and Amide I. Moreover the shift of Amide II bond is a result of the interaction between amine group and it means that new interactions are form between those groups and tannic acid.

The porosity of scaffold and its density measurement results are shown in TABLE 3.

TABELA 1. Parametry mechaniczne: moduł Younga (E_{mod}) oraz siła ściskająca (F_{max}) zmierzone dla kompozytów chitozanu/kolagenu (CTS/Coll), chitozanu/kolagenu z 1% kwasem hialuronowym (CTS/Coll/1HA), 2% (CTS/Coll/2HA) oraz 5% (CTS/Coll/5HA) z 2, 5, 10 oraz 20% dodatkiem kwasu taninowego (TA).

TABLE 1. Mechanical parameters as Young modulus (E_{mod}) and compressive strength (F_{max}) measured for chitosan/collagen scaffolds (CTS/Coll), chitosan/collagen with 1% hyaluronic acid (CTS/Coll/1HA), 2% (CTS/Coll/2HA) and 5% (CTS/Coll/5HA) with 2, 5, 10 and 20% addition of tannic acid (TA).

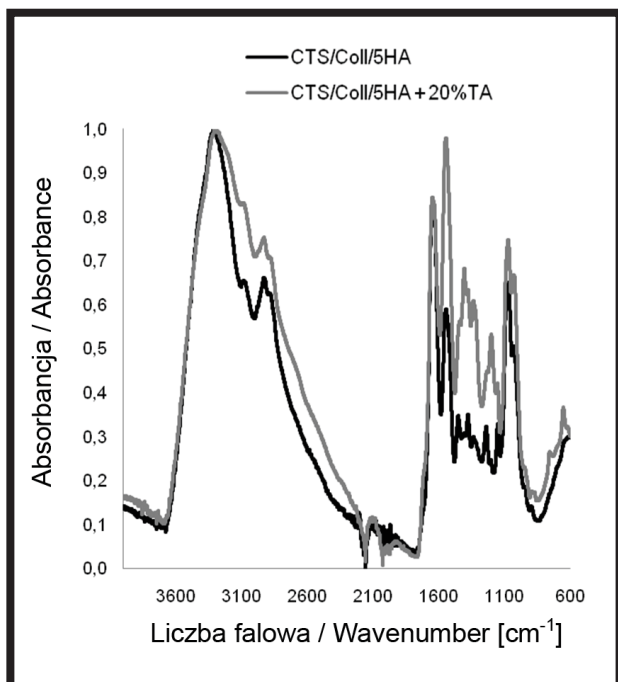
Scaffold Scaffolds	E_{mod} [kPa]	F_{max} [kPa]
bez dodatku TA / without tannic acid (TA)		
CTS/Coll	1.95 ± 0.15	8.02 ± 0.16
CTS/Coll/1HA	3.92 ± 0.11	14.35 ± 0.12
CTS/Coll/2HA	5.73 ± 0.09	18.99 ± 0.09
CTS/Coll/5HA	5.17 ± 0.05	15.05 ± 0.11
2% TA		
CTS/Coll	19.2 ± 5.2	13.2 ± 2.1
CTS/Coll/1HA	6.8 ± 2.0	13.5 ± 0.4
CTS/Coll/2HA	28.6 ± 4.4	24.0 ± 4.2
CTS/Coll/5HA	36.4 ± 5.9	32.8 ± 2.7
5% TA		
CTS/Coll	23.4 ± 3.5	13.0 ± 1.3
CTS/Coll/1HA	13.0 ± 3.0	19.1 ± 1.9
CTS/Coll/2HA	21.6 ± 3.7	25.5 ± 2.3
CTS/Coll/5HA	34.9 ± 2.9	34.3 ± 2.5
10% TA		
CTS/Coll	13.9 ± 3.1	11.9 ± 1.4
CTS/Coll/1HA	13.0 ± 2.6	17.4 ± 0.6
CTS/Coll/2HA	29.4 ± 3.8	30.3 ± 1.0
CTS/Coll/5HA	35.5 ± 6.4	37.3 ± 3.7
20% TA		
CTS/Coll	16.1 ± 2.1	13.1 ± 1.6
CTS/Coll/1HA	12.2 ± 2.0	18.4 ± 0.7
CTS/Coll/2HA	17.0 ± 0.8	26.4 ± 1.4
CTS/Coll/5HA	41.1 ± 5.2	35.9 ± 1.8

Widma w podczerwieni zostały wykonane celem określenia położenia charakterystycznych grup w strukturze kolagenu, chitozanu oraz kwasu hialuronowego, jak również określenia wystąpienia wiązań lub oddziaływań między polimerami oraz pomiędzy polimerami i środkiem sieciującym. Przykładowe widma próbek chitozanu, kolagenu oraz 5% dodatku kwasu hialuronowego z 20% dodatkiem taniny (CTS/Coll/5HA+20%TA) oraz bez czynnika sieciującego (CTS/Coll/5HA) zostały przedstawione na RYS. 1. Natomiast wszystkie wyniki analizy w podczerwieni zostały zestawione w TABELI 2.

TABELA 2. Charakterystyczne grupy funkcyjne kompozytów chitozanu oraz kolagenu z 2% dodatkiem kwasu taninowego (CTS/Coll+2%TA) oraz 20% (CTS/Coll+20%TA), jak również chitozanu i kolagenu z 5% dodatkiem kwasu hialuronowego oraz 2% kwasu taninowego (CTS/Coll/5HA+2%TA) oraz 20% (CTS/Coll/5HA+20%TA).

TABLE 2. Characteristic bands in IR spectra of chitosan/collagen scaffolds with 2% addition of tannic acid (CTS/Coll+2%TA) and 20% (CTS/Coll+20%TA) as well as chitosan/collagen and 5% addition of hyaluronic acid with 2% of tannic acid (CTS/Coll/5HA+2%TA) and 20% (CTS/Coll/5HA+20%TA).

Liczba falowa [cm^{-1}] Wavenumber [cm^{-1}]	Grupa funkcyjna Characteristic group
CTS/Coll	
3334	Amidowe A / Amide A
1628	Amidowe I / Amide I
1534	Amidowe II / Amide II
1245	Amidowe III / Amide III
1067	C–O–C
CTS/Coll+2%TA	
3329	Amidowe A / Amide A
1629	Amidowe I / Amide I
1519	Amidowe II / Amide II
1243	Amidowe III / Amide III
1066	C–O–C
CTS/Coll+20%TA	
3324	Amidowe A / Amide A
1620	Amidowe I / Amide I
1514	Amidowe II / Amide II
1233	Amidowe III / Amide III
1067	C–O–C
CTS/Coll/5HA	
3335	Amidowe A / Amide A
1644	Amidowe I / Amide I
1538	Amidowe II / Amide II
1239	Amidowe III / Amide III
1072	C–O–C
CTS/Coll/5HA+2%TA	
3315	Amidowe A / Amide A
1635	Amidowe I / Amide I
1538	Amidowe II / Amide II
1239	Amidowe III / Amide III
1070	C–O–C
CTS/Coll/5HA+20%TA	
3313	Amidowe A / Amide A
1631	Amidowe I / Amide I
1524	Amidowe II / Amide II
1200	Amidowe III / Amide III
1072	C–O–C



RYS. 1. Widma IR skafoldu chitozanu, kolagenu oraz 5% dodatku kwasu hialuronowego z 20% dodatkiem taniny (CTS/Coll/5HA+20%TA) oraz bez czynnika sieciującego (CTS/Coll/5HA).

FIG. 1. IR spectra of chitosan, collagen, 5% hyaluronic acid with 20% addition of tannic acid (CTS/Coll/5HA + 20%TA) and without it (CTS/Coll/5HA).

Dodatek kwasu hialuronowego powoduje przesunięcie położenia pasm w widmach IR charakterystycznych grup. Może to sugerować, iż oddziałuje on z kolagenem oraz chitozaniem, prawdopodobnie poprzez tworzenie wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych. Lokalizacja grupy C-O-C nie zmienia się więcej niż o 4 cm^{-1} , co jest rozdzielczością aparatu. Dodatek kwasu taninowego powoduje przesunięcie pików pasma pochodzącego od grup amidowej A oraz III dla mieszaniny chitozanu oraz kolagenu, natomiast dla kompozytów z kwasem hialuronowym przesunięcie jest obserwowane dla pasma amidowego A oraz I. Oznacza to pojawienie się nowych oddziaływań między tymi właśnie grupami a kwasem taninowym.

Porowatość skafoldu oraz gęstość próbek została zmierzona, a wyniki przedstawione w TABELI 3.

Dodatek kwasu hialuronowego zwiększa porowatość oraz gęstość próbek bez dodatku kwasu taninowego. Wraz ze wzrostem ilości kwasu taninowego porowatość rośnie w przypadku wszystkich próbek. Parametry te zależą od obecności kwasu taninowego, gdzie porowatość oraz gęstość rosną wraz ze wzrostem zawartości czynnika sieciującego. Wśród próbek z tą samą zawartością kwasu taninowego próbki z 5% dodatkiem kwasu hialuronowego mają niższą porowatość niż próbki z mniejszą zawartością kwasu lub bez jego dodatku.

Strukturę kompozytów chitozanu, kolagenu oraz kwasu hialuronowego z dodatkiem kwasu taninowego zaobserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Przykładowe zdjęcia SEM przedstawione są na RYS. 2. Nie mniej jednak wszystkie skafoldy zostały zbadane i scharakteryzowane jako materiały porowate z porami wzajemnie połączonymi [16,17]. Skafoldy bez dodatku kwasu hialuronowego mają strukturę bardziej warstwową niż próbki bez kwasu.

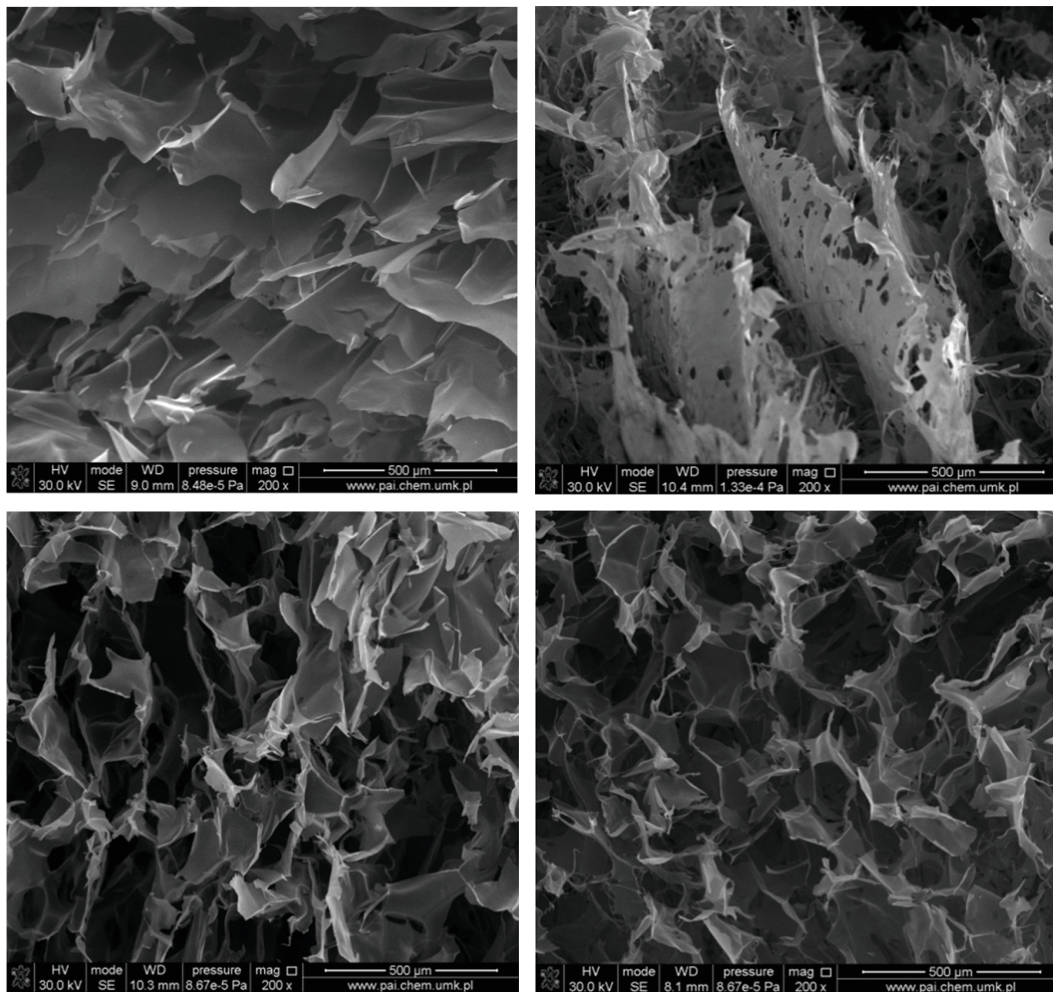
TABELA 3. Porowatość (ϵ) oraz gęstość (d) próbek z oraz bez dodatku kwasu taninowego.

TABLE 3. The porosity (ϵ) and density (d) of samples with and without tannic acid addition.

Skafold Scaffold	ϵ [%]	d [mg/cm ³]
bez dodatku TA / without tannic acid (TA)		
CTS/Coll	60	19
CTS/Coll/1HA	65	21
CTS/Coll/2HA	69	39
CTS/Coll/5HA	71	43
2% TA		
CTS/Coll	71	40
CTS/Coll/1HA	73	46
CTS/Coll/2HA	72	12
CTS/Coll/5HA	56	23
5% TA		
CTS/Coll	78	44
CTS/Coll/1HA	74	54
CTS/Coll/2HA	76	16
CTS/Coll/5HA	71	25
10% TA		
CTS/Coll	84	45
CTS/Coll/1HA	79	56
CTS/Coll/2HA	89	24
CTS/Coll/5HA	72	27
20% TA		
CTS/Coll	91	24
CTS/Coll/1HA	81	20
CTS/Coll/2HA	91	33
CTS/Coll/5HA	77	33

Addition of hyaluronic acid increases the porosity and density for samples without tannic acid. After the increasing addition of tannic acid the porosity increases for all the samples. Those parameters depend on the tannic acid content, where porosity and density increase with increasing amount of tannic acid. With the same amount of tannic acid samples with 5% addition of hyaluronic acid have lower porosity than samples with lower content of HA or without it.

The structure of chitosan, collagen and hyaluronic acid scaffolds with tannic acid addition was observed with the use of scanning electron microscope. In the FIG. 2 examples of SEM images are shown. Nevertheless all obtained 3D samples were studied and they are characterized by porous structures with interconnected pores [16,17]. Scaffolds without hyaluronic acid have more layer by layer structure than those without it.



RYS. 2. Zdjęcia wykonane skaningowym mikroskopem elektronowym: a) CTS/Coll +2%TA, b) CTS/Coll +20%TA, c) CTS/Coll/5HA +2%TA, d) CTS/Coll/5HA +20%TA.

FIG. 2. Scanning electron microscope images of: a) CTS/Coll +2%TA, b) CTS/Coll +20%TA, c) CTS/Coll/5HA +2%TA, d) CTS/Coll/5HA +20%TA.

Wnioski

Nowe materiały kompozytowe mogą być otrzymane na bazie chitozanu, kolagenu oraz kwasu hialuronowego. Mogą być one sieciowane poprzez dodatek kwasu taninowego. Właściwości mechaniczne otrzymanych materiałów zależą od zawartości polimerów oraz procesu sieciowania. Dodatek kwasu hialuronowego zmniejsza sztywność skafoldu, ponieważ kwas hialuronowy silnie absorbuje wodę z powietrza. To sugeruje, iż materiał jest bardziej elastyczny. Proces sieciowania zachodzi na skutek formowania nowych oddziaływań elektrostatycznych oraz wiązań wodorowych, które wpływają na zmianę struktury materiałów oraz ich właściwości. Porowatość oraz gęstość materiału jest związana ze składem próbek. Dodatek kwasu taninowego zwiększa porowatość poprzez formowanie oddziaływań oraz reorganizację struktury skafoldu. Wszystkie otrzymane materiały są porowate z wzajemnie połączonymi porami, co jest niezbędne w przypadku potencjalnego ich zastosowania w inżynierii tkankowej.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować Narodowemu Centrum Nauki za finansowanie badań w ramach projektu UMO-2013/11/B/ST8/04444.

Conclusions

New scaffolds can be obtained on the base of chitosan, collagen and hyaluronic acid. They can be cross-linked by addition of tannic acid. The mechanical properties of obtained scaffolds depend on the content of polymers used as well as on cross-linking process. Addition of hyaluronic acid reduces the stiffness of scaffolds because hyaluronic acid is hygroscopic. It suggests that materials are more elastic. The cross-linking process takes place by the presence of new interactions such as hydrogen bonds and electrostatic interactions which influence the scaffold structure and properties. The porosity and density of the scaffolds depends on the content of natural polymers. Addition of tannic acid increases the porosity due to the formation of new interactions and reorganization of scaffolds structure. All samples obtained in this study are porous with interconnected pores what is required for the scaffolds used in tissue engineering.

Acknowledgments

Financial support from the National Science Centre (NCN, Poland), grant no UMO-2013/11/B/ST8/04444 is gratefully acknowledged.

- [1] Vafaei S.N., Esmaeili M., Amini M., Atyabi F., Ostad S.N., Dinarvand R.: Self assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential carrier for targeting the inflamed intestinal mucosa. *Carbohydrate Polymers* 144 (2016) 371-381.
- [2] Tobiishi M., Sayo T., Yoshida H., Kusaka A., Kawabata K., Sugiyama Y., Ishikawa O., Inoue S.: Changes in epidermal hyaluronan metabolism following UVB irradiation. *Journal of Dermatological Science* 64 (2011) 31-38.
- [3] Kraft J.N., Lynde C.W.: Moisturizers: What they are and a practical approach to product selection. *Skin Therapy Letter* 10 (2005) 1-8.
- [4] Dong C., Lv Y.: Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. *Polymers* 8 (2016) 1-20.
- [5] Ricard-Blum S.: The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2011) 1-20.
- [6] Faarvang A.S., Rørdam Preil S.A., Nielsen P.S., Beck H.C., Kristensen L.P., Rasmussen L.M.: Smoking is associated with lower amounts of arterial type I collagen and decorin. *Atherosclerosis* 247 (2016) 201-206.
- [7] Lazaridou A., Biliaderis C.G.: Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers* 48 (2002) 179-190.
- [8] Rinaudo M.: Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31 (2006) 603-632.
- [9] Dutta P.K., Dutta J., Tripath V.S.: Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research* 63 (2004) 20-31.
- [10] Zeng Q., Qin J., Yin X., Liu H., Zhu L., Dong W., Zhang S.: Preparation and hemocompatibility of electrospun O-carboxymethylchitosan/PVA nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* 133 (2016).
- [11] Parida P., Behera A., Mishra S.C.: Classification of biomaterials used in medicine. *International Journal of Advances in Applied Sciences* 8 (2012) 31-35.
- [12] Sionkowska A., Kaczmarek B., Lewandowska K.: Characterisation of chitosan after cross-linking by tannic acid. *Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 19 (2014) 135-138.
- [13] Martínez A., Blanco M.D., Davidenko N., Cameron R.E.: Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydrate Polymers* 132 (2015) 606-619.
- [14] Dhayal S.K., Gruppen H., de Vries R., Wierenga P.A.: Controlled formation of protein nanoparticles by enzymatic cross-linking of α -lactalbumin with horseradish peroxidase. *Food Hydrocolloids* 36 (2014) 53-59.
- [15] Natarajan V., Krithica N., Madhan B., Sehgal P.K.: Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 5 (2013) 560-567.
- [16] Sionkowska A., Planecka A.: Preparation and characterization of silk fibroin/chitosan composite sponges for tissue engineering. *Journal of Molecular Liquids* 178 (2013) 5-14.
- [17] Sionkowska A., Kaczmarek B., Lewandowska K., Grabska S., Pokrywczyńska M., Klosowski T., Drewna T.: 3D composites based on the blends of chitosan and collagen with the addition of hyaluronic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 89 (2016) 442-448.