

BIOMATERIAŁY NA BAZIE KOLAGENU I HYDROLIZATÓW ELASTYNY MODYFIKOWANE PROMIENIOWANIEM UV

J.SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA^{1*}, A.SIONKOWSKA¹, R.JOACHIMIĄK², A.KAŻNICA², T.DREWA², K.BAJER³, J. DZWONKOWSKI³

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

² UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA, COLLEGIUM MEDICUM, UL. KARŁOWICZA 24, 85-092 BYDGOSZCZ

³ INSTYTUT PRZETWÓRSTWA TWORZYW SZTUCZNYCH „METALCHEM”, UL. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 55, 87-100 TORUŃ

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

[*Inżynieria Biomateriałów, 69-72, (2007), 67-69*]

Wstęp

Kolagen i elastyna to podstawowe białka tkanki łącznej. Szczególnie obficie występują w tkankach narażonych na duże obciążenia mechaniczne, takich jak więzadła, kości, naczynia krwionośne skóra i płuca. Kolagen zapewnia narządom i tkankom wytrzymałość, natomiast elastyna elastyczność [1]. Kolagen cechuje niska immunogenność, dobre właściwości hemostatyczne oraz niewielka tendencja do powodowania odczynów zapalnych. Podobnie jak elastyna jest nietoksyczny i biodegradowalny. Oba biopolimery są łatwo dostępne i stanowią dobre podłoże dla wzrostu komórek [2-4]. Te właściwości pozwalają uznać oba białka za dobry surowiec do produkcji materiałów o potencjalnych zastosowaniach medycznych. Obecnie na rynku dostępne są biomateriały na bazie kolagenu, jednak elastyna jest rzadko wykorzystywana [1]. Głównym problemem w pracy i komercyjnym zastosowaniu elastyny jest jej wysoka nierozpuszczalność spowodowana występowaniem dużej ilości wiązań sieciujących. Z tego względu zastosowano w badaniach hydrolizaty elastyny, jako surowiec bardziej użyteczny dla aplikacji biomedycznych.

Celem pracy było zbadanie właściwości mechanicznych oraz biologicznych nowych materiałów opartych na kolagenu i hydrolizatach elastyny oraz określenie wpływu promieniowania ultrafioletowego jako czynnika modyfikującego i sterylizującego powierzchnię próbek.

Materiały i metodyka badań

Roztwór kolagenu ze ścięgien ogonowych młodych szczurów w 0,1M kwasie octowym został sporządzony w naszym laboratorium zgodnie z wcześniej opisaną metodyką [4].

Nierozpuszczalną elastynę uzyskano oczyszczając aorty świńskie metodą Lansing'a. Aorty zostały pozbawione otaczających tkanek i następnie odtłuszczone przez ekstrakcję w etanolu, mieszaninie etanolu i eteru oraz w eterze. Tkankę umieszczono w 0,1M roztworze NaOH i ogrzewano przez 50 min do temperatury 95°C. Otrzymany materiał rozdrobniono w ciekłym azocie.

Proszek elastynowy (1g) poddano hydrolizie w mieszaninie 50ml tert-butanolu i 50ml 1M KOH w czasie 48h w temperaturze pokojowej. Otrzymany roztwór zneutralizowano kwasem octowym i zdjalizowano względem wody dejonizowanej.

THE MODIFICATION OF NEW COLLAGEN –ELASTIN HYDROLYSATES BIOMATERIALS BY ULTRAVIOLET IRRADIATION

J.SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA^{1*}, A.SIONKOWSKA¹, R.JOACHIMIĄK², A.KAŻNICA², T.DREWA², K.BAJER³, J. DZWONKOWSKI³

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

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

³ INSTITUTE FOR PLASTICS PROCESSING, MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 55, 87-100 TORUN, POLAND

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

[*Inżynieria Biomateriałów, 69-72, (2007), 67-69*]

Introduction

Elastin and collagen are a structural proteins in animals where they are the main components of connective tissues. They are particularly abundant in load-bearing tissues such as ligaments, bones, arteries, skin and lung. Collagen provides a tensile strength whereas elastin gives elasticity to organs and tissues [1]. Collagen exhibits low antigenicity, low inflammatory and cytotoxic responses, good hemostatic properties and controllable biodegradability. Elastin is non-toxic and has the molecular architecture that is inherent in natural tissues. The both biopolymers are readily available and promote cell growth [2-4]. These properties points out that collagen and elastin are a good candidates for production of materials for many potential medical applications. Few products based at collagen are commercially applied, however, elastin is rarely used in bioimplants [1]. The main limitation in work with elastin is a extremely high insolubility caused by presence of crosslinkages – desmosine and isodesmosine. For this reason elastin hydrolysates were used in our investigations as a more useful for biomedical applications. A good way for obtaining new materials can be a preparation of a mixture of collagen and elastin hydrolysates as a valuable alternative for synthetic biomaterials.

The aim o this work was to study the mechanical properties and biocompatibility of new biomaterials performed on collagen and elastin hydrolysates. The influence of ultraviolet light, as a factor which modify the properties and sterilize the surface of the material, was also investigated.

Materials and methods

The solution of collagen from tail tendons of young albino rats in 0,1M acetic acid was obtained in our laboratory [4].

Insoluble elastin was purified from pig aortas by Lansing's method. Pig's aorta was cleaned from adhering tissues and de-fatted by sequential extractions in ethanol, mixture of ethanol/ether (50/50) and ether. The tissue was placed in 0.1M NaOH and heated to 95°C for 50 minutes. Dry material was minced in liquid nitrogen [5].

Elastin powder (1g) was hydrolysed in a mixture of 50ml of tert-butanol and 50ml of 1M KOH for 48h at room temperature. The resulting solution was neutralised with acetic acid and then dialysed against deionised water.

Protein blends were prepared by mixing of collagen and elastin hydrolysates solutions in appropriate weight ratios (95:/5, 75/25, 50/50).

Mieszanki białek otrzymano przez zmieszanie roztworów kolagenu i hydrolizatów elastyny w odpowiednich stosunkach wagowych (95:5, 75/25, 50/50).

Cienkie filmy otrzymano przez wylanie roztworów na wypoziomowane płytki szklane i odparowanie rozpuszczalnika.

Próbki napromieniano wysokociśnieniową lampą rtęciową, Philips TUV-30, emitującą głównie światło o długości fali 254nm, w powietrzu, w temperaturze pokojowej w odległości 5cm od źródła. Intensywność promieniowania zmierzono przy pomocy IL 1400A Radiometer (International Light, USA) i wynosiła 2 W/m².

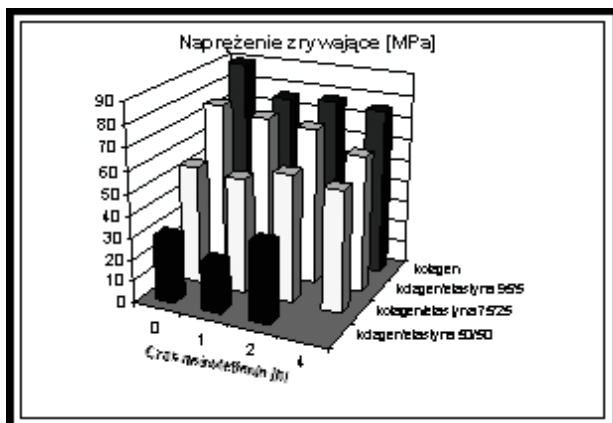
Właściwości mechaniczne takie jak naprężenie zrywające i wydłużenie względne zmierzono przy użyciu aparatu TIRAtest 27025.

Do badań użyto linii transformowanych fibroblastów mysich 3T3. Komórki hodowano w sterylnych butelkach hodowlanych o powierzchni wzrostu 25 cm² i 12-dółkowych płytkach hodowlanych firmy Greiner (Niemcy). Do hodowli linii 3T3 użyto medium DMEM/Ham's F12 z dodatkiem 10% surowicy wołowej (FBS), amfotericyny B (5µg/ml) oraz penicyliny/streptomycyny z L-glutaminą (100U/ml/100µg/ml). Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Do oznaczenia żywotności i proliferacji komórek 3T3 na matrycach z kolagenu/elastyny, komórki posiano na płytki 12-dółkowe w ilości 2.5x10⁴ kom/dółek. Komórki hodowano przez 7 dni, a następnie usuwano medium i przeprowadzano test MTT.

Wyniki i dyskusja

Zależność naprężenia zrywającego (UTS), i wydłużenia przy zerwaniu od czasu napromieniania przedstawiono na RYSUNKACH 1 i 2. Nienaświetlany kolagen wykazuje najwyższą wartość UTS i wydłużenia względnego spośród badanych próbek. Parametry te maleją dla filmów z kolagenu i mieszaniny kolagen/elastyna 95/5 wraz z wydłużeniem czasu naświetlania, podczas gdy w przypadku filmów o wyższej zawartości elastyny obserwuje się wzrost UTS po 2h napromieniania. Prawdopodobnie jest to związane z powstawaniem wiązań sieciujących pomiędzy cząsteczkami. Wartość wydłużenia względnego dla mieszanin początkowo znacznie maleje, by po dłuższym naświetlaniu (2h, 4h) wzrosnąć. Filmy o wysokiej zawartości hydrolizatów elastyny



RYS.1. Zależność naprężenia zrywającego od czasu naświetlania dla filmów z kolagenu i mieszanin z hydrolizatami elastyny.

FIG.1. The dependence of tensile strength of collagen and collagen/elastin hydrolysates films before and after UV irradiation.

Protein films were obtained by solvent evaporation from solutions poured onto glass plates.

The samples were irradiated in air at room temperature at a distance of 5cm from the light source, using a mercury lamp, Philips TUV-30, which emits light mainly at a wavelength of 254nm. The intensity of radiation, measured using an IL 1400A Radiometer (International Light, USA), was 2 W/m².

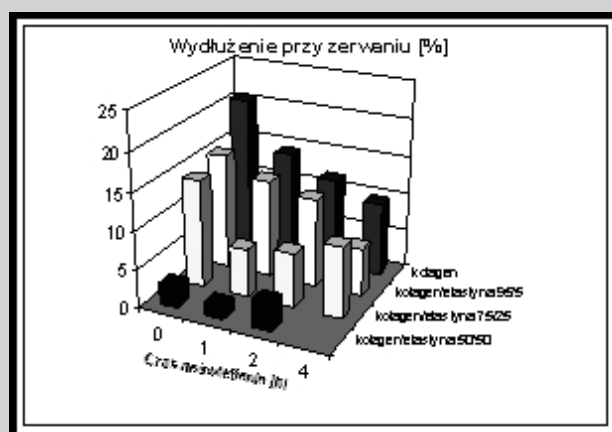
The mechanical properties as ultimate tensile strength and ultimate percentage elongation have been investigated by TIRAtest 27025.

3T3 cell line was used in experiment. Cells were grown in sterile tissue culture plastics from Greiner (Germany) with growth surface 25 cm² or 12-well plates. Cells were cultured in medium which contained Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) and Ham's F12 Medium (3:1). DMEM/Ham's F12 medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), amphotericin B (5µg/ml), penicillin/streptomycin+L-glutamine (100U/ml / 100µg/ml). DMEM/Ham's F12 medium, fetal bovine serum (FBS) and antibiotics solution were obtained from PAA (Austria). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere comprising of 5% CO₂ and 95% air.

To investigate the viability and proliferation 3T3 cells on collagen/elastin matrices cells were seeded on 12-well plates at a density of 2.5x10⁴ per well. Cells grew in complete medium for 7 days. Then culture medium was removed and MTT assay was performed.

Results and discussion

The dependence of ultimate tensile strength, UTS, and ultimate percentage of elongation on the UV irradiation time are shown on FIGURE 1 and 2, respectively. UTS and ultimate percentage of elongation for collagen is better than for blends. Both parameters decrease for collagen and collagen/elastin 95/5 films after UV irradiation, whereas UTS of films with higher content of elastin hydrolysates increase after 2 hours of irradiation. It may suggest that ultraviolet light initiate crosslinking reaction between collagen and elastin hydrolysates. The ultimate percentage elongation for blends is lower after irradiation, however after 2 hours of exposition on UV light increase of this value is observed. Films with

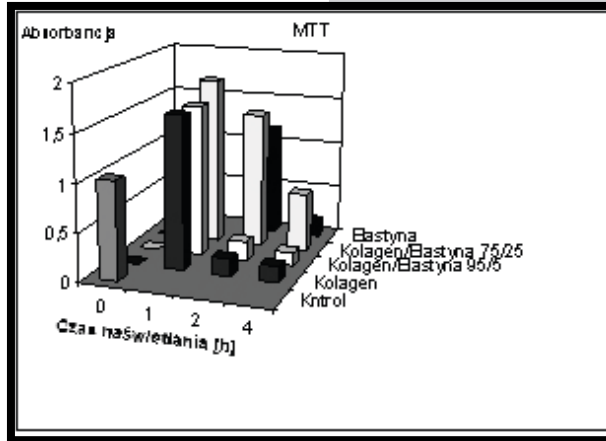


RYS.2. Zależność wydłużenia przy zerwaniu od czasu naświetlania dla filmów z kolagenu i mieszanin z hydrolizatami elastyny.

FIG.2. The dependence ultimate percentage elongation and collagen/elastin hydrolysates films before and after of collagen and collagen/elastin hydrolysates films before and after UV irradiation.

(powyżej 50%) są zbyt kruche, by mogły zostać komercyjnie wykorzystane.

W celu oceny właściwości biologicznych filmów z kolagenu, hydrolizatów elastyny i mieszanin przeprowadzono na nich badanie wzrostu komórek 3T3. Komórki hodowane na nienasświetlanych próbkach przez tydzień wykazywały kształt kulisty, co świadczy o braku powinowactwa do powierzchni badanych materiałów. Na podstawie wyników testów MTT, przedstawionych na RYSUNKU 3, uznano je za martwe. Przy kontakcie z filmami napromienianymi morfologia komórek była podobna do obserwowanej w próbie kontrolnej. Dla filmów po 1h naświetlania obserwuje się znaczący wzrost przeżywalności komórek. Najlepsze rezultaty otrzymano dla próbek kolagen/elastyna 75/25.



RYS. 3. Ocena przeżywalności komórek 3T3 na filmach z kolagenu, elastyny i mieszanin przed i po naświetlaniu za pomocą testu MTT.
FIG.3. The MTT assay testing 3T3 cells viability on collagen, elastin and collagen/elastin films before and after UV irradiation after one week.

higher amount of elastin hydrolysates than 50% are very fragile and it is impossible to employ them commercially.

To assess the biological performance of films made from collagen, elastin hydrolysates and blends, the response of 3T3 cells grown was investigated. After one week, cells seeded on non-irradiated samples showed a rounded morphology. It points at inadequate surface for cell growth. However the cells in contact with irradiated films reveal a morphology similar to observed on control (data not showed). MTT results are presented on FIGURE 3. Cells seeded on non-irradiated films were considered as non viable. After 1 hour of irradiation of the samples a significant increase of viability of cells is observed. The highest absorbances are observed

for collagen/elastin 75/25 films.

Wnioski

Na podstawie badań stwierdzono, że promieniowanie UV jest odpowiednim czynnikiem modyfikującym dla filmów kolagenowo-elastynowych. Wprawdzie obserwuje się niewielkie pogorszenie właściwości mechanicznych takich jak UTS i wydłużenie przy zerwaniu, jednak biokompatybilność znacząco rośnie.

Conclusion

Our study demonstrated that UV irradiation is a good factor for modification of collagen/elastin films. Although mechanical properties as UTS and elongation at break slightly decrease after irradiation, but significant increase of biocompatibility is observed.

Piśmiennictwo

- [1] W.F.Daamen, H.Th.B van Moerkerk, T. Hafmans, L. Buttafoco, A.A. Poot, J.H. Veerkamp, T.H. van Kuppevelt, *Biomaterials* 2003, Vol. 24, 4001-4009
- [2] J.Habermehl, J. Skopinska, F. Boccafoschi, A. Sionkowska, H. Kaczmarek, G. Laroche, D. Mantovani, *Macromolecular Bioscience* 2005, Vol. 5, 821-828
- [3] A.Sionkowska, J. Skopinska, M. Wisniewski, A. Leznicki, J. Fisz, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2006, Vol. 85, 79-84

References

- [4] A.Sionkowska, J. Skopinska, M. Wisniewski, A. Leznicki, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2007, Vol. 86, 186-191
- [5] T. B. W. N.T. Sosokel, L.B. Sandberg, *Methods of Enzymology* 144 (1987) 196-214.

KOMPOZYTY CERAMIKA-POLIMER DO ZASTOSOWAŃ STOMATOLOGICZNYCH

A.CWALIŃSKA, M.SZAFRAN*, G. ROKICKI, M. BIERNAT

POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ CHEMICZNY,
 UL. NOAKOWSKIEGO 3, 00-664 WARSZAWA, POLSKA

*E-MAIL: SZAFRAN@CH.PW.EDU.PL

Streszczenie

W artykule przedstawiono wyniki badań nad otrzymaniem nowych materiałów kompozytowych do zastosowań stomatologicznych. Jednym ze składników fazy organicznej był nowy, rozgałęziony monomer uretano-metakrylowy UM1. Charakteryzuje się on ponad cztery razy mniejszym skurczem polimeryzacyjnym w porównaniu do powszechnie stosowanej w stomato-

CERAMIC-POLYMER COMPOSITES FOR DENTAL APPLICATION

A.CWALIŃSKA, M.SZAFRAN*, G. ROKICKI, M. BIERNAT

WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF CHEMISTRY,
 3, NOAKOWSKIEGO STREET, 00-664 WARSAW, POLAND

*E-MAIL: SZAFRAN@CH.PW.EDU.PL

Abstract

This paper presents results of research on obtaining new composite materials for dental application. One of the components of organic phase is new, branched UM1 urethane-methacrylic monomer. The monomer shows over four times lower polymerization shrinkage in comparison to commonly used in dentistry Bis-GMA – based resin. Applied inorganic fillers