

## Wnioski

Serię warstw, o różnej strukturze oraz o różnej zawartości krzemu, azotu i węgla, osadzono na podłożu Ti Grade 2, w procesie MWCVD. Zmianę składu chemicznego warstw uzyskano poprzez odpowiedni dobór składu mieszaniny gazów reakcyjnych ( $\text{SiH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ , Ar). Otrzymano warstwy amorficzne typu:  $\text{SiC}_x$ ,  $\text{Si}_x\text{N}_y$ , i  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ . W badaniach właściwości tribologicznych potwierdzono, że w sposób istotny zależą one od udziału poszczególnych pierwiastków. Najlepsze właściwości wykazują próbki z warstwą węglaozotku krzemu, które łączą właściwości twardego  $\text{SiC}$  i bardziej elastycznego  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .

## Conclusions

The series of the layers of various atomic structures and various contents of silicon, nitrogen and carbon were deposited on Ti Grade 2 at MWCVD processing. A differentiation of the chemical composition was achieved thanks to the proper choice of the reactive gas mixture composition ( $\text{SiH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ , Ar). The amorphous layers of the following types were formed:  $\text{SiC}_x$ ,  $\text{Si}_x\text{N}_y$  and  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ .

It has been shown that the tribological properties of the synergic "substrate - layer" system depend on the chemical composition of the layer. The best operational parameters has been found in the case of  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layers which combine properties of hard  $\text{SiC}$  and more flexible  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .

## Piśmiennictwo

- [1] Nałęcz M.: Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000. Tom 4 Biomateriały, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003.
- [2] Geetha M., Singh A. K., Asokamani R., Gogia A. K.: Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. Progress in Materials Science 54 (2009) 397 - 425.
- [3] Marciniak J.: Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej 2002.
- [4] Miinomi M.: Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. Science and Technology of Advanced Materials 4 (2003) 445 - 454.
- [5] Miinomi M.: Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials I (2008) 30 - 42.
- [6] Liu X., Chu P. K., Ding Ch.: Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Materials Science and Engineering R 47 (2004) 49 - 121.
- [7] E. Vassallo, A. Cremona, F. Ghezzi, F. Delleria, L. Laguardia, G. Ambrosone, U. Coscia: Structural and optical properties of amorphous hydrogenated silicon carbonitride films produced by PECVD. Applied Surface Science 252 (2006) 7993 - 8000.

## References

- [8] W. Kafrouni, V. Rouessac, A. Julbe, J. Durand: Synthesis of PECVD a-  $\text{SiC}_x\text{N}_y\text{:H}$  membranes as molecular sieves for small gas separation. Journal of Membrane Science 329 (2009) 130 - 137.
- [9] M. T. Kim, J. Lee: Characterization of amorphous  $\text{SiC:H}$  films deposited from hexamethyldisilazane. Thin Solid Films 303 (1997) 173 - 179.
- [10] C. Vautrin - UI, C. Boisse - Laporte, N. Benissad, A. Chausse, P. Leprince, R. Messina: Plasma - polymerized coatings using HMDSO precursor for iron protection. Progress in Organic Coating 38 (2000) 9 - 15.
- [11] L. S. Patil, R. K. Pandey, J. P. Bange, S. A. Gaikwad, D. K. Gautman: Effect of deposit temperature on the chemical properties of thermally deposited silicon nitride films. Optical materials 27 (2005) 663 - 670.
- [12] R. Gonzalez- Luna, M. T. Rodrigo, C. Jimenez, J. M. Martinez-Duart: Deposition of silicon oxinitride films from hexamethyldisilazane (HMDS) by PECVD. Thin Solid Films 317 (1998) 347-350.

## CHARAKTERYSTYKA USIECIOWANYCH BIOMATERIAŁÓW NA BAZIE KOLAGENU I ELASTYNY

J.SKOPINSKA-WISNIEWSKA\*, A.SIONKOWSKA, M.GAWRON,  
J.KOZŁOWSKA, A.PŁANECKA

UNIwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii,  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń, Polska  
\*MAILTO: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101,(2010),97-99]

### Wstęp

Kolagen i elastyna to białka strukturalne, będące głównymi komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej. Kolagen charakteryzuje się bardzo wysoką wytrzymałością na rozciąganie, podczas gdy elastyna wykazuje niezwykłą elastyczność. Właściwości mechaniczne obu białek znakomicie się uzupełniają, dzięki czemu kolagen i elastyna zapewniają odporność mechaniczną tkankom łącznym różnego rodzaju. Szczególnie bogate w te białka są tkanki i organy poddane

## THE CHARACTERIZATION OF CROSS-LINKED COLLAGEN AND COLLAGEN/ELASTIN BASED BIOMATERIALS

J.SKOPINSKA-WISNIEWSKA\*, A.SIONKOWSKA, M.GAWRON,  
J.KOZŁOWSKA, A.PŁANECKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY, 7  
GAGARINA STREET, 87-100 TORUN, POLAND  
\*MAILTO: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101,(2010),97-99]

### Introduction

Collagen and elastin are structural proteins, the main components of extracellular matrix. The collagen reveals high tensile strength whereas the elastin exhibits unusual elasticity. The mechanical properties of these proteins are complementary and provide a resilience of all kinds of connective tissues. Especially the load-bearing tissues such as bones, tendons, lungs, skin and arteries are collagen and elastin rich. In addition, the proteins ability to improving the

znacznym obciążeniami, bądź wielokrotnemu rozciąganiu takie jak kości, ścięgna, płuca, skóra, naczynia krwionośne. Kolagen i elastyna wspomagają adhezję i proliferację komórek, które następnie wytwarzają elementy macierzy zewnątrzkomórkowej. Dzięki tym cechom oba białka od wielu już lat znajdują się w kręgu zainteresowań badaczy z dziedziny technologii biomateriałów i inżynierii tkankowej [1-3]. Jednakże, zarówno zastosowanie, jak i badanie tych białek jest ograniczone ze względu na stosowane obecnie procedury ich oczyszczania. Natywna elastyna, ze względu na bardzo wysoki stopień usieciowania, jest nierozpuszczalna. To sprawia, że komercyjnie dostępne rozpuszczalne postaci elastyny otrzymywane są na drodze hydrolizy, która powoduje zniszczenie unikalnej trójwymiarowej struktury białka i w konsekwencji zmianę właściwości. Stąd, prowadzone są badania nad przywróceniem niezwyklej architektury składników macierzy zewnątrzkomórkowej [4].

Celem pracy było zbadanie zmian właściwości biomateriałów na bazie kolagenu i elastyny w skutek sieciowania termicznego w różnych warunkach.

## Materiały i metody

Roztwór kolagenu ze ścięgien ogonowych młodych szczurów w 0,1M kwasie octowym został sporządzony w naszym laboratorium zgodnie z wcześniej opisaną metodą [5].

Nierozpuszczalną elastynę uzyskano oczyszczając aorty świnię metodą Lansing'a. Aorty zostały pozabawione otaczających tkanek i odfuszczone. Tkankę umieszczono w 0,1M roztworze NaOH i ogrzewano przez 50 min w temperaturze 95°C. Otrzymany materiał rozdrobniono w ciekłym azocie [6]. Proszek elastynowy (1g) poddano hydrolizie zasadowej. Otrzymany roztwór zneutralizowano kwasem octowym i dializowano względem wody dejonizowanej.

Mieszanki białek otrzymano przez dodanie do roztworu kolagenu i zmieszanie 10% hydrolizatów elastyny (w przeliczeniu na suchą masę). Cienkie filmy otrzymano przez wylanie roztworów na wypoziomowane płytki szklane i odparowanie rozpuszczalnika.

Próbki wygrzewano w 60°C i 100°C przez 2 i 24 godziny.

## Wyniki i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonej analizy termicznej filmów kolagenowych oraz kolagenowo-elastynowych, zarówno niesieciowanych jak i poddanych sieciowaniu termicznemu w różnych warunkach, stwierdzono, że degradacja termiczna przebiega w dwóch etapach. Pierwszy etap rozkładu, widoczny pomiędzy 25°C i 100°C, związany jest z odparowaniem wody zaabsorbowanej przez białka. Zaobserwowano, że  $T_{max}$  pierwszego etapu rozkładu termicznego usieciowanych materiałów kolagenowych jest niższa niż dla filmów nie poddanych sieciowaniu (TAB.1). Obniżenie temperatury jest szczególnie widoczne w przypadku wygrzewania w czasie 2 godzin, zarówno w temperaturze 60°C jak i 100°C. Dla próbek kolagenowo-elastynowych zanotowano natomiast wzrost temperatury parowania wody absorpcyjnej po sieciowaniu w 60°C. Efekt ten może być związany z uwieżeniem cząsteczek wody w usieciowanej strukturze materiału. Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy ubytkami mas dla próbek kolagenowo-elastynowych przed i po sieciowaniu.

Drugi etap rozkładu termicznego materiałów na bazie kolagenu i elastyny obserwowany jest pomiędzy temperaturą 280°C i 400°C i wiąże się z odparowaniem wody związanej oraz rozkładem termicznym łańcucha polipeptydowego i

cells adhesion and promoting the production of extracellular matrix from proliferating cells, makes that collagen and elastin have been the focus in biomaterials technology and tissue engineering since many years [1-3]. However, the use of the proteins, particularly the elastin, is limited because of the procedures of purification which are applied nowadays. Native elastin is extremely insoluble owing to its cross-linking degree. Commercially available soluble elastins are obtained from the insoluble protein by hydrolysis, which destroys its unique 3-D structure. So, many scientists work on the reconstruction of the architecture of main components of the extracellular matrix [4].

The aim of our work was the study the influence of different thermal cross-linking conditions on properties of collagen-elastin based biomaterials.

## Materials and methods

The solution of collagen from tail tendons of young albino rats in 0,1M acetic acid was obtained in our laboratory [5].

Insoluble elastin was purified from pig aortas by Lansing's method. Pig's aorta was cleaned from adhering tissues and de-fatted by extractions in ethanol an ether. The tissue was placed in 0.1M NaOH and heated to 95°C for 50 minutes. Dry material was minced in liquid nitrogen [6]. Elastin powder (1g) was hydrolysed in an alkaline conditions. The resulting solution was neutralised with acetic acid and then dialysed against deionised water .

The collagen/elastin samples were prepared by addition of 10% of elastin hydrolysates The protein films were obtained by solvent evaporation from solutions poured onto glass plates.

The samples were heated at 60°C and 100°C during 2h and 24h.

## Results and discussion

During thermal analysis the two-stages of degradation process were noted. The first stage (between 25 and 100°C) is connected with the evaporation of water absorbed

Specimen	I stage	
	$T_{max}$ [°C]	$\Delta m$ [%]
Collagen not cross-linked	66,82	13,87
Collagen; 60°C, 2h	49,87	12,40
Collagen; 60°C, 24h	62,30	10,80
Collagen; 100°C, 2h	52,13	14,79
Collagen; 100°C, 24h	66,82	13,94
Collagen/elastin not cross-linked	77,00	7,59
Collagen/elastin; 60°C, 2h	81,50	7,26
Collagen/elastin; 60°C, 24h	80,39	7,51

**TABELA 1. Wartości temperatur i ubytków masy I etapu degradacji termicznej filmów z kolagenu i mieszanin kolagenu z hydrolizatami elastyny przed i po sieciowaniu termicznym; temperatura w maksimum szybkości procesu ( $T_{max}$ ) i ubytek masy następujący w czasie ogrzewania ( $\Delta m$ ).**

**TABLE 1. Thermal parameters for the I stage of thermal decomposition of collagen and collagen/elastin films before and after thermal cross-linking; the temperature of the maximum speed of the process ( $T_{max}$ ) and the mass decrement during the heating process ( $\Delta m$ ).**

Specimen	II stage	
	T <sub>max</sub> [°C]	Δm [%]
Collagen not cross-linked	308,99	62,43
Collagen; 60°C, 2h	321,40	58,76
Collagen; 60°C, 24h	308,88	50,98
Collagen; 100°C, 2h	306,98	70,27
Collagen; 100°C, 24h	313,22	71,70
Collagen/elastin not cross-linked	314,85	69,27
Collagen/elastin; 60°C, 2h	316,26	65,39
Collagen/elastin; 60°C, 24h	311,81	61,78

**TABELA 2.** Wartości temperatur i ubytków masy II etapu degradacji termicznej filmów z kolagenu i mieszanin kolagenu z hydrolizatami elastyny przed i po sieciowaniu termicznym; temperatura w maksimum szybkości procesu (T<sub>max</sub>) i ubytek masy następujący w czasie ogrzewania (Δm).

**TABLE 2.** Thermal parameters for the II stage of thermal decomposition of collagen and collagen/elastin films after thermal cross-linking; the temperature of the maximum speed of the process (T<sub>max</sub>) and the mass decrement during the heating process (Δm).

wytworzeniem małocząsteczkowych, często lotnych, produktów degradacji. Proces ten zachodzi z maksymalną szybkością w temperaturze około 309°C dla materiału kolagenowego i 315°C w przypadku filmów z dodatkiem elastyny (TAB.2). Wyrzwanie próbek w 60°C przez 2 godziny powoduje wzrost wartości Tmax drugiego etapu rozkładu termicznego. Zmiana ta świadczy o zwiększeniu liczby wiązań poprzecznych w badanym materiale. Także zmniejszenie wartości ubytków mas potwierdza, iż sieciowanie próbek w opisanych warunkach prowadzi do stabilizacji struktury filmów białkowych. Należy również zauważyć, że wygrzewanie w 60°C prowadzi do uzyskania bardziej termostabilnego materiału niż prowadzenie procesu w 100°C.

Zaobserwowano także, że w efekcie sieciowania termicznego dochodzi do wytworzenia w próbkach nierozpuszczalnego żelu, co dodatkowo potwierdza tworzenie nowych wiązań sieciujących. Stwierdzono, że ilość powstającego żelu jest większa w przypadku próbek zawierających oba białka, niż dla filmów kolagenowych (TAB.3). Sugeruje to, że obecność hydrolizatów elastyny sprzyja tworzeniu nowych wiązań sieciujących w skutek działania podwyższonej temperatury. Efekt ten może być związany z większą mobilnością stosunkowo krótkich łańcuchów hydrolizatów elastyny, dzięki czemu łatwiej dochodzi do zbliżenia odpowiednich grup funkcyjnych obecnych w białkach i uczestniczących w tworzeniu nowych wiązań.

## Piśmiennictwo

- [1] W.F.Daamen, H.Th.B van Moerkerk, T. Hafmans, L. Buttafoco, A.A. Poot, J.H. Veerkamp, T.H. van Kuppevelt, Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 2003, Vol. 24, 4001-4009
- [2] A.J. Bailey, Molecular mechanisms of ageing in connective tissues, *Mechanisms of Ageing and Development*, 2001, Vol. 122, 735-755
- [3] J. Skopińska-Wiśniewska, A. Sionkowska, A. Kamińska, A. Kaźnica, R. Jachimak, T. Drewna, Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration, *Applied Surface Science*, 2009, Vol. 255, 8286-8292

Specimen	Gel [%]
Collagen; 60°C, 2h	97,53
Collagen; 60°C, 24h	97,63
Collagen; 100°C, 2h	97,35
Collagen; 100°C, 24h	86,28
Collagen/elastin not cross-linked	98,52
Collagen/elastin; 60°C, 2h	99,47
Collagen/elastin; 60°C, 24h	99,58

**TABELA 3.** Zawartość żelu dla filmów z kolagenu i kolagenu z dodatkiem hydrolizatów elastyny poddanych sieciowaniu termicznemu.

**TABLE 3.** The amount of gel in collagen and collagen/elastin films after thermal cross-linking

to proteins. For cross-linked collagen we observed that Tmax of this stage was lower than for non cross-linked one (Tab.1). Especially for samples heated by 2h, both in 60°C and 100°C, we observed the lower values of Tmax. However, for collagen/elastin specimens the temperature of water evaporation increased after heating at 60°C. It shows that molecules of water were trapped in cross-linked structure. In case of collagen/elastin films the alteration of weight loss in the first stage after thermal modification was not significant.

In the second stage (between 280 and 400°C) water bounded to proteins is released and small molecular products of thermal degradation of polypeptides are formed. The maximum speed of the process was observed around 309°C for collagen and 315°C for collagen/elastin films (Tab.2). The heating of the specimen in 60°C by 2h caused increase the value of the temperature of maximum speed of the process. It suggests that the new cross-linking bonds were created. The lower values of mass decrement confirm that these conditions lead to the stabilization of the structure of protein samples. It should be noted that heating at 100°C is not so effective as a cross-linking at 60°C.

After thermal cross-linking we observed the gel formation, what confirmed that additional cross-links have been formed. The highest amount of gel (among specimen studied) was noted for collagen/elastin films (TAB.3). We can conclude that the presence of elastin hydrolyzates makes creation of new cross-linking bonds easier. It could be connected with higher mobility of short elastin hydrolyzates chains than collagen polypeptides.

## References

- [4] K. Miyamoto, M. Atarashi, H. Kadozono, M. Shibata, Y. Koyama, M. Okai, A. Inakuma, E. Kitazono, H. Kaneko, T. Takebayashi, T. Horiuchi, Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibres controlled cell-differentiation with new cross-linker, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, Vol. 45, 33-41
- [5] J.Habermehl, J. Skopinska, F. Boccafoschi, A. Sionkowska, H. Kaczmarek, G. Laroche, D. Mantovani, Preparation of ready-to-use, stockable and reconstituted collagen, *Macromolecular Bioscience* 2005, Vol. 5, 821-828
- [6] T.B.W.N.T. Sosokel, L.B. Sandberg, Isolation and characterization of insoluble and soluble elastin, *Methods of Enzymology* 144 (1987) 196-214.