

OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI POROWATYCH TRÓJWYMIAROWYCH SKAFOLDÓW KOLAGENOWYCH

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

UNIwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
WYDZIAŁ CHEMII, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 22-24*]

Wprowadzenie

Kość jest materiałem kompozytowym, złożonym z substancji nieorganicznej, organicznej oraz wody. Substancją organiczną tworzą włókna kolagenowe, natomiast minerał kości stanowi hydroksyapatyt ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp) w postaci nanokryształów. Dlatego też hydroksyapatyt oraz kolagen wydają się być odpowiednimi składnikami do wytwarzania biomateriałów służących do rekonstrukcji ubytków kości. Kolagen typu I, ze względu na swoje właściwości, m.in. biokompatybilność, biodegradowalność, jest uważany za jeden z najbardziej użytecznych biomateriałów. Syntetyczny hydroksyapatyt, z uwagi na swe chemiczne i mineralogiczne podobieństwo do substancji nieorganicznej kości i zębów, charakteryzuje się znakomitą biokompatybilnością i bioaktywnością.

Metodyka

Kolagen otrzymano ze ścięgien młodych szczurów albinosów w warunkach laboratoryjnych. Hydroksyapatyt (nanocząstki, <200 nm) zakupiono w firmie Sigma-Aldrich. Przygotowano kompozyt kolagenu i hydroksyapatytu poprzez dodanie odpowiedniej ilości hydroksyapatytu do roztworu kolagenu (stosunek wagowy HAp do kolagenu wynosił 70/30). Metodą liofilizacji otrzymano skafoldy, które następnie usieciowano za pomocą 1-etylo-3(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu (EDC) i imidu N-hydroksy kwasu bursztynowego (NHS) (RYS.1).

Morfologię porowatych próbek oceniono za pomocą Skaningowego Mikroskopu Elektronowego (SEM) (LEO Electron Microscopy Ltd, Anglia). Przed obrazowaniem próbkę zamrożono w ciekłym azocie i przecięto na pół skalpelem, po czym poddano napyleniu złotem.

Obliczono gęstość i porowatość otrzymanego kompozytu metodą wypierania cieczy przez zanurzone w niej ciało. Do pomiarów użyto izopropanolu.

Wyznaczono stopień spęcznienia badanego kompozytu. W tym celu zważono suche gąbki kolagenowe (W_d), po czym zanurzone je w 5 ml buforu fosforanowego (PBS, pH=7,4) na 2h, 24h, 48h i 72h, w 37°C. Po określonym czasie wyjęto próbki z buforu PBS i ponownie zważono (W_w). Stopień spęcznienia (E_{sw}) obliczono ze wzoru:

$$E_{sw} = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100\%$$

Wyniki i dyskusja

Metoda liofilizacji pozwala na otrzymanie próbek w postaci trójwymiarowych, porowatych gąbek (skafoldów), które mogą znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej. Na RYSUNKACH 2 a-b przedstawiono zdjęcia SEM otrzymanego kompozytu HAp/Col.

PREPARATION AND PROPERTIES OF A POROUS THREE- DIMENSIONAL COLLAGEN SCAFFOLDS

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, TORUN,
FACULTY OF CHEMISTRY, BIOPOLYMER RESEARCH GROUP,
7 GAGARINA STR., 87-100 TORUN, POLAND
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 22-24*]

Introduction

Natural bone is a complex inorganic-organic composite material, in which hydroxyapatite nanocrystals ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp) and collagen fibrils (Col) are well organized into hierarchical architecture. Synthetic hydroxyapatite and collagen composites (HAp/Col) have the potential in mimicking and replacing skeletal bones. Their combination should be beneficial for bone tissue engineering due to their natural biological resemblance and properties. Collagen type I provides an excellent basis for biomaterials as it is readily available, non-toxic and its fibril architecture is inherent in natural tissues. Synthetic hydroxyapatite (HAp) has excellent biocompatibility and bioactivity due to its chemical and structural resemblance to mineral bone and tooth.

Materials and methods

Collagen was obtained in our laboratory from tail tendons of young rats. Hydroxyapatite (nanopowder, <200 nm particle size) was supplied by the company of Sigma-Aldrich. The starting materials for the final HAp/Col composite were mixed and the concentration and amount of the starting substances were set for HAp/Col weight ratio to be 70/30. Scaffolds were prepared by lyophilization. The HAp/Col sample was cross-linked using N-(3-dimethylamino propyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) combined with N-hydroxysuccinimide (NHS) in water solution (FIG.1).

The morphology of porous samples was studied using Scanning Electron Microscopy (SEM) (LEO Electron Microscopy Ltd, England). Scaffolds were cut with a razor scalpel after being frozen in liquid nitrogen for 3 min and were sputter-coated with a layer of gold for observation.

The density and porosity of the fabricated 3D scaffolds were measured by liquid displacement. The liquid used in this study was isopropanol.

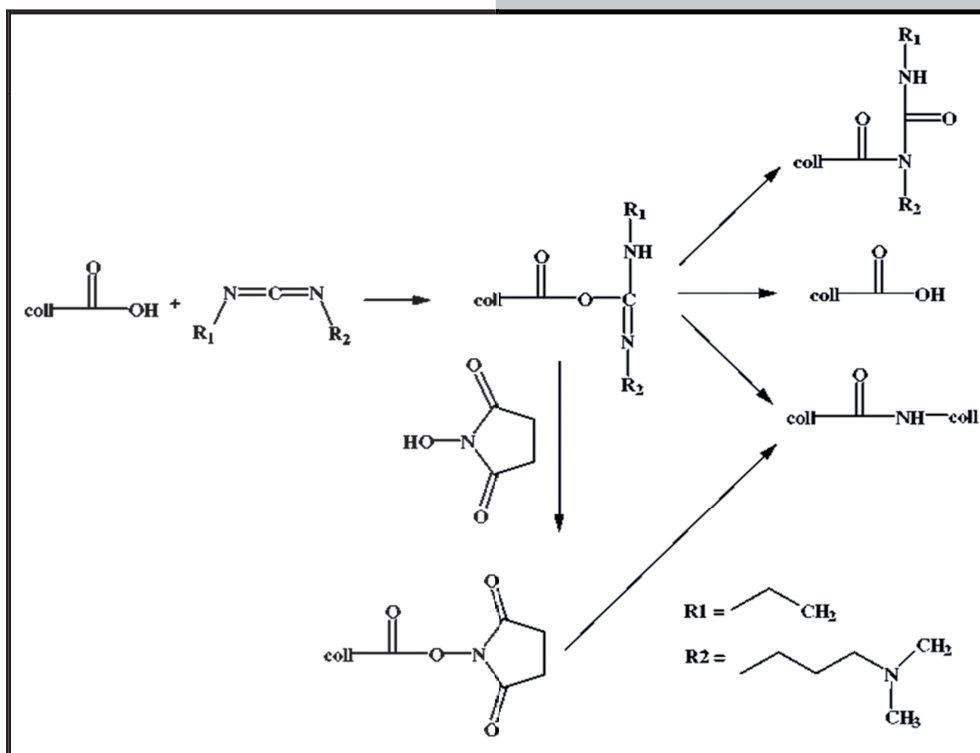
The weighted samples (W_d) were immersed in 5 ml phosphate buffer saline (PBS, pH=7,4) for 2, 24, 48, and 72h at 37°C. At each time point, scaffolds were taken out of the solution and weighted (W_w). Water uptake of scaffold was calculated according the following equation:

$$\text{swelling ratio (\%)} = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100$$

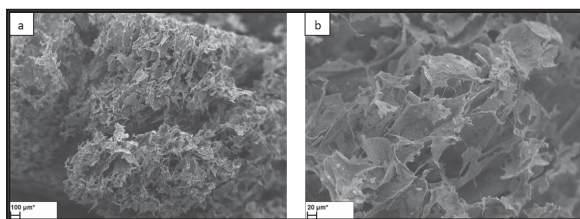
Results and discussion

Freeze drying of HAp/Col blend leads to porous three-dimensional sponge, mimicking the extracellular matrix of bone tissue. FIG.2 a-b shows the SEM image of the HAp/Col composite.

Generally, HAp/Col scaffold was highly porous and interconnected, and appeared to be relatively homogeneous throughout the bulk of the scaffold.



RYS. 1. Sietowanie skafoldu HAp/Kol za pomocą mieszaniny sieciującej EDC/NHS [1].
FIG. 1. Cross-linking of samples in EDC/NHS [1].



RYS. 2. Zdjęcia SEM kompozytu HAp/Col w różnym powiększeniu: a) x100, b) x500.
FIG. 2. SEM image of HAp/Col composite: a) x100, b) x500.

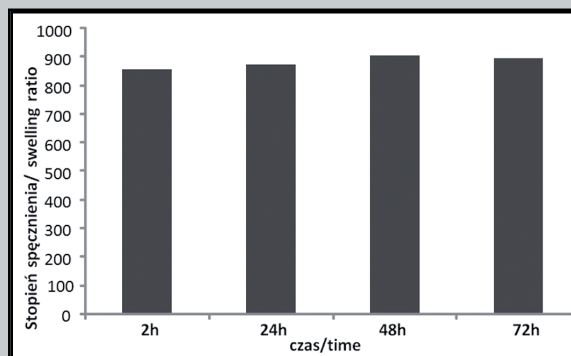
Zdjęcia SEM wskazują, iż otrzymano trójwymiarowy, wysoce porowaty kompozyt, z połączonymi wzajemnie porami, o względnie jednorodnej strukturze.

Porowatość otrzymanego metodą liofilizacji kompozytu HAp/Col wynosi 84,5%, z kolei gęstość 0,069 g/cm³.

Wyniki pomiarów stopnia spęcznienia badanej próbki przedstawiono na RYSUNKU 3. Przedstawione wartości są średnią z pomiarów 3 próbek. Po 2h pęcznienia próbek w buforze PBS został osiągnięty maksymalny, ustabilizowany stopień spęcznienia badanego kompozytu.

Wnioski

Otrzymano trójwymiarowy, porowaty materiał kompozytowy złożony z kolagenu typu I i nanohydroksyapatytu, który ma szansę być wykorzystany w inżynierii tkankowej. Metoda liofilizacji pozwala na otrzymanie próbek o strukturze wysoce porowatej. Sietowanie gąbek kolagenowych za pomocą mieszaniny sieciującej EDC/NHS jest efektywną, bezpieczną metodą modyfikacji właściwości otrzymanych kompozytów.



RYS. 3. Stopień spęcznienia kompozytu HAp/Col po różnym czasie zanurzenia w buforze PBS.
FIG. 3. Swelling ratio of hydroxyapatite/collagen composite in different soaking times.

The HAp/Col scaffolds prepared by freeze-drying had porosity 84,5% and density 0,069 g/cm³.

Swelling ratio of collagen matrices containing 70 mass % of hydroxyapatite are shown in FIG.3. Value was averaged from three parallel measurements. After 2h the swelling ratio was constant.

Conclusions

3D composite material obtained from collagen type I and nano-hydroxyapatite is suitable for tissue engineering. Highly porous HAp/collagen scaffolds, with an interconnected pore structure, were produced in this study by a freeze-drying technique. Crosslinking of HAp/collagen scaffolds using an EDC/NHS system proves to be an easy, effective and contaminant free technique.

••••• Piśmiennictwo

[1] Sloviová A., Vojtová L., Jančař J., Preparation and modification of collagen-based porous scaffold for tissue engineering. *Chemical Papers* (2008), 62, 417–422.

[2] Teng S.H., Lee E.J., Wang P., Kim H.E., Collagen/hydroxyapatite composite nanofibers by electrospinning. *Materials Letters* (2008), 62, 3055–3058.

References

[3] Gelinsky, M., Welzel, P.B., Simon, P., Bernhardt, A., König, U. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone *Chemical Engineering Journal* (2008), 137, 84–96.

[4] Shen X., Chen L., Cai X., Tong T., Tong H., Hu J., A novel method for the fabrication of homogeneous hydroxyapatite/collagen nanocomposite and nanocomposite scaffold with hierarchical porosity *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2011), 22, 299–305

WŁAŚCIWOŚCI KOLAGENU WYIZOLOWANEGO Z ŁUSEK RYB Z GATUNKU *ESOX LUCIUS*

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU,
WYDZIAŁ CHEMII, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 24-26*]

Wprowadzenie

Kolagen jest białkiem występującym w organizmach zwierzęcych, szeroko stosowanym w przemyśle medycznym i farmaceutycznym. Jednak wysoki koszt tego białka znacznie ogranicza możliwości jego zastosowania. Obecnie głównymi źródłami pozyskiwania kolagenu typu I są skóry bydłace i świńskie. Jednak, na skutek wystąpienia u bydła zwyrodnienia gąbczastego (BSE) oraz innych zakaźnych encefalopatii gąbczastych (TSE), a także pryszczycy (FMD) u świń i bydła, surowce rzeźne są już mniej atrakcyjnym źródłem tego białka. Kolagen typu I można również wyizolować ze skór, kości, płetw czy łusek ryb. Ryby spożywane są codziennie na całym świecie w dużych ilościach. Ponad 30% rybich odpadów to skóry, łuski i kości, które są bogatym źródłem kolagenu. Dlatego odpady rybne mogą być alternatywnym, bezpiecznym źródłem kolagenu, stąd też nastąpił wzrost zainteresowania i badań naukowych w tej dziedzinie.

W pracy przedstawiono metodykę i właściwości kolagenu wyizolowanego z łusek ryb z gatunku *Esox lucius*. Jest to ryba słodkowodna, występująca w krajach o umiarkowanym klimacie.

Metodyka

Kolagen wyizolowano z łusek rybich, poprzez demineralizację oraz rozpuszczenie w kwasie octowym. Za pomocą spektrometru rentgenowskiego (EDX) oznaczono zawartości pierwiastków w łusce i potwierdzono całkowite rozpuszczenie fosforanu wapnia. Wykonano widmo FTIR filmu kolagenowego oraz przeprowadzono analizę składu aminokwasowego. Temperaturę denaturacji kolagenu wyznaczono

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN FROM FISH (*ESOX LUCIUS*) SCALE

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, TORUN ,
FACULTY OF CHEMISTRY, BIOPOLYMER RESEARCH GROUP,
7 GAGARINA STR., 87-100 TORUN, POLAND
E-MAIL: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 24-26*]

Introduction

Collagen is the most abundant protein found in animal body and widely used for biomedical and pharmaceutical applications. However, its applicability is severely limited due to high cost. At present, the main sources of type I collagen are bovine or porcine dermis. However, due to outbreak of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE), Foot and Mouth Disease (FMD) in pigs, cattle, use of collagen and collagen derived products from these sources have been limited. Type I collagen has also been extracted from skin, bone, fins, and scales of fresh water and marine fishes. In various parts of the world, different fish species are being consumed daily in large quantities. More than 30% of fish processing wastes consist of skin, scale and bone, which are very rich in collagen. Thus, fish processing wastes may be alternative collagen sources and these underutilized resources have attracted the increasing attention of scientists all over the world.

In the present study, collagen was isolated from scales of *Esox lucius*. This fish is found in fresh water of temperate countries.

Materials and methods

Collagen was isolated from fish scale, a calcified tissue, through demineralization following acetic acid treatment. Energy dispersive X-ray (EDX) analysis of demineralized scale was carried out for quantitative estimation of inorganic content. The isolated and purified collagen was characterized by FTIR and amino acid analysis. The denaturation