

THE STABILITY OF SOME COLLAGEN HYDROGELS

STABILITATEA UNOR HIDROGELURI DE COLAGEN

Madalina Georgiana ALBU^{1*}, Irina TITORENCU^{2,3}, Ciprian CHELARU¹

¹ INCDTP – Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu St., 031215, Bucharest, Romania, email: albu_mada@yahoo.com

² "Petru Poni" Institute of Macromolecular Chemistry, Iasi, Romania, email: firina@yahoo.com

³ "Nicolae Simionescu" Institute of Cellular Biology and Pathology, Bucharest, Romania, email: firina@yahoo.com

THE STABILITY OF SOME COLLAGEN HYDROGELS

ABSTRACT. Hydrogel dressings are cross-linked polymer gels that are often shaped into sheets to provide and maintain a moist environment on site of wound application. Biological hydrogels are widely used as cell-culture substrates because of their resemblance to the natural extracellular matrix and complex signaling which facilitate the adhesion and growth of cells. In this study the collagen gels were cross-linked with glutaraldehyde in order to obtain a stable structure without any cytotoxic effects. The obtained hydrogels were characterized by thermal analysis, FT-IR spectroscopy, as well as enzymatic degradation and their biocompatibility with endothelial cells was monitored by optic and fluorescence microscopy. The hydrogels cross-linked with 0.4-1.0% did not show any cytotoxic effect in contact with endothelial cells. The hydrogel with 1.2% collagen and 0.8% GA is the most stable and could be a basic promising biomaterial for tissue engineering and drug delivery systems.

KEY WORDS: hydrogels, collagen, biodegradation, endothelial cells.

STABILITATEA UNOR HIDROGELURI DE COLAGEN

REZUMAT. Pansamentele sub formă de hidrogel au la bază geluri polimerice reticulare care se prezintă de cele mai multe ori sub formă de folii tridimensionale, pentru a oferi și menține un mediu umed pe rânilor pe care sunt aplicate. Hidrogelurile biologice sunt utilizate pe scară largă ca substraturi pentru culturi de celule datorită asemănării lor cu matricea extracelulară naturală și semnalului complex care facilitează adheziunea și creșterea celulelor. În acest studiu, gelurile de colagen au fost reticulate cu glutaraldehidă în scopul de a obține hidrogeluri – structuri stabile, fără efecte citotoxice. Hidrogelurile obținute au fost caracterizate prin analiză termică, spectroscopie FT-IR, degradare enzimatică monitorizându-se biocompatibilitatea lor cu celulele endoteliale prin microscopie optică și fluorescentă. Hidrogelurile reticulate cu 0,4-1,0% glutaraldehidă nu au prezentat niciun efect citotoxic în contact cu celulele endoteliale. Hidrogelul cu 1,2% colagen și 0,8% glutaraldehidă este cel mai stabil și ar putea fi un biomaterial de bază promițător pentru ingineria tisulară și pentru sistemele de cedare a medicamentelor.

CUVINTE CHEIE: hidrogeluri, colagen, biodegradare, celule endoteliale.

LA STABILITÉ DE QUELQUES HYDROGELS DE COLLAGÈNE

RÉSUMÉ. Les pansements à hydrogel sont basées sur des gels de polymère réticulés qui se trouve souvent sous la forme des feuilles tridimensionnelles, pour fournir et maintenir un milieu humide sur les blessures où ils sont appliqués. Les hydrogels biologiques sont largement utilisés comme substrats pour les cultures cellulaires en raison de leur similitude avec la matrice extracellulaire naturelle et le signal complexe qui facilite l'adhérence et la croissance des cellules. Dans cette étude, des gels de collagène ont été réticulés avec du glutaraldéhyde en vue d'obtenir d'hydrogels – des structures stable sans effets cytotoxiques. Les hydrogels obtenus ont été caractérisés par analyse thermique, spectroscopie FT-IR, dégradation enzymatique est en surveillant leur biocompatibilité avec les cellules endothéliales par la microscopie optique et la fluorescence. Les hydrogels réticulés avec 0,4 à 1,0% glutaraldéhyde n'ont montré aucun effet cytotoxique en contact avec les cellules endothéliales. L'hydrogel à 1,2% collagène et 0,8% glutaraldéhyde est le plus stable et pourrait être un biomatériau de base prometteur pour l'ingénierie tissulaire et pour les systèmes d'administration des médicaments.

MOTS-CLÉS: hydrogels, collagène, biodégradation, cellules endothéliales.

INTRODUCTION

The collagen-based biomaterials have a large variety of forms such as: gels / hydrogels, membranes / films, spongyous (matrices, fibres), sutures, tubes, composites [1].

Hydrogels are elastic, three-dimensional porous networks that can swell with up to 90% water, which allows them to transmit loads, making them an attractive material for biomedical and tissue

INTRODUCERE

Biomaterialele pe bază de colagen au o mare varietate de forme, cum ar fi: geluri / hidrogeluri, membrane / filme, structuri spongioase (matrici, fibre), suturi, tuburi, componete [1].

Hidrogelurile sunt rețele tri-dimensionale poroase, elastice, care se pot umfla în prezența apei cu până la 90%, ceea ce le permite să transmită sarcini, făcându-le un material atractiv pentru aplicații

* Correspondence to: Madalina Georgiana ALBU, INCDTP – Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu St., 031215, Bucharest, Romania, email: albu_mada@yahoo.com

engineering applications [2]. The high water content and soft consistency of hydrogels minimize mechanical irritation upon administration [3]. Furthermore, it has been shown that hydrogels are well tolerated and biocompatible *in vivo* [4]. Depending on the type of polymer and the type of cross-link, they are also biodegradable [5].

There are numerous applications of hydrogels in the medical and pharmaceutical fields, such as contact lenses, membranes for biosensors, sutures, drug delivery systems, and as matrices for repairing and regenerating a wide variety of tissues and organs [6, 7].

In contrast to the sponge-like systems, the hydrogel consists of a very dense, highly concentrated gel. The hydrogel has a series of advantages over a dry matrix, namely homogeneous adhesion to the affected parts, easy removal without damage to renewed skin and slightly faster rate of reconstruction of the injured skin [8]. Natural-based hydrogels have attracted medical and pharmaceutical interests due to their non-toxicity, biocompatibility and biodegradability. One of the most important polymers for such hydrogels is collagen and it has an advantage over synthetic polymers because it is derived from living organisms.

Hydrogels are chemically or physically cross-linked hydrophilic networks that do not dissolve in water at a physiological temperature or pH, but swell considerably in an aqueous medium [9].

In order to achieve a suitable thickness of the hydrogel-layer, different cross-linking materials are used [8]. Depending on type and/or concentration of crosslinking agent, hydrogels may be chemically stable or they may degrade and eventually disintegrate and dissolve. In the cross-linked state, cross-linked hydrogels reach an equilibrium swelling level in aqueous solutions which depends mainly on the crosslink density.

The natural biodegradable polymers such as collagen are often cross-linked with various compounds to obtain water-insoluble hydrogels. So far, several cross-linkers have been used, including glutaraldehyde, carbodiimide and epoxy compounds [10]. However, these cross-linkers, which remain in the resulting hydrogels, usually show high toxicity [11, 12]. Therefore, it is necessary to develop an alternative, low-toxicity cross-linker or proper concentration for using cross-linking agent.

biomedicale și ale ingineriei tisulare [2]. Conținutul mare de apă și consistența moale a hidrogelurilor minimizează iritațiile mecanice după administrare [3]. În plus, s-a demonstrat că hidrogelurile sunt bine tolerate și biocompatibile *in vivo* [4]. În funcție de tipul de polimer și de tipul de agent de reticulare, acestea sunt biodegradabile [5].

Există numeroase aplicații ale hidrogelurilor în domeniile medicale și farmaceutice, cum ar fi lentilele de contact, membranele pentru biosenzori, suturi, sisteme de cedare a medicamentelor precum și suporturi pentru repararea și regenerarea a unei mari varietăți de țesuturi și organe [6, 7].

Spre deosebire de sistemele de tip burete (matrici spongioase), hidrogelurile constau într-un gel foarte dens și foarte concentrat. Avantajele hidrogelului față de o matrice uscată sunt omogenitatea adeziunii la părțile afectate, înlăturarea ușoară fără deteriorarea pielii reinnoite și o viteză mai mare de reconstrucție a pielii lezate [8]. Hidrogelurile naturale au stârnit interesul medical și farmaceutic deoarece acestea nu sunt toxice, sunt biocompatibile și biodegradabile. Unul dintre cei mai importanți polimeri pentru realizarea unor astfel de hidrogeluri este colagenul și are un avantaj față de polimerii sintetici, deoarece este derivat din organisme vii.

Hidrogelurile sunt rețele hidrofile reticulate chimic sau fizic, care nu se dizolvă în apă la temperatură sau pH-ul fiziological dar se umflă considerabil într-un mediu apăs [9].

Pentru a obține o grosime dorită a stratului de hidrogel, sunt utilizați diferiți agenți de reticulare [8]. În funcție de tipul și/sau de concentrația agentului de reticulare, hidrogelurile pot fi stabile chimic sau se pot degrada și, în cele din urmă, dezintegra și dizolva. În forma reticulată, hidrogelurile ajung la un nivel de echilibru în soluțiile apoase ce depinde în principal de densitate.

Polimerii naturali biodegradabili, cum este colagenul, sunt adesea reticulați cu diverse compuși pentru a obține hidrogeluri insolubile în apă. Până în prezent au fost utilizati mai mulți agenți de reticulare, inclusiv glutaraldehida, carbodiimida și compușii epoxidici [10]. Cu toate acestea, agenții de reticulare care rămân în hidrogelurile rezultante prezintă o toxicitate ridicată [11, 12]. Prin urmare, este necesar să se dezvolte agenți de reticulare alternativi cu toxicitate scăzută sau de concentrație corespunzătoare pentru utilizarea agentului de reticulare.

Due to the fact that the use of glutaraldehyde as cross-linking agent is still a controversy problem in biomaterials field, the aim of this study is to investigate its proper concentrations which can be used in collagen hydrogel obtaining without any cytotoxic effects and to determine their thermal and enzymatic stability.

MATERIALS AND METHODS

Type I collagen gels were obtained from bovine hide using the protocol that has been previously described [1]. The gel of 1.2% collagen and pH 2.5 was adjusted at 7.4 pH with 1M NaOH. The adjusted gel was cross-linked with different percentages (between 0 and 1%) of glutaraldehyde (GA) from Merck, Germany, cast in Petri dishes (3 cm diameter) and kept 24 h at 4°C in order to obtain hydrogels.

Collagenase type I, *C. histolyticum*, was purchased from Sigma-Aldrich (USA). Chemicals used for cell cultures were obtained from Sigma (Germany). Tissue culture plates were purchased from Nunc (Germany). The human endothelial cell line, EA hy 926 (human umbilical vein cell line) was obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC).

FT-IR spectral measurements were recorded by spectrophotometer Jasco FT/IR-4200. All the spectra were recorded at the following parameters: spectral range 4000-510 cm^{-1} , resolution 4 cm^{-1} with 30 acquisitions per each sample.

The shrinking temperature measurements were recorded at 22 to 100°C with a heating rate of 2°C/min using the micro-hot-table technique with a Caloris Micro Hot Table in co-work with a Leica Stereomicroscope.

Enzymatic degradation of collagen hydrogels was investigated by monitoring the weight loss depending on exposure time to collagenase solution. 2 g of collagen hydrogels were accurately weighed, placed in PBS solution and collagenase (1g/mL) and incubated at 37°C. At regular intervals the swollen scaffolds were removed from degradation solution, blotted dry and weighed. The percent of hydrogel degradation was determined by the following relation:

$$\begin{aligned}\% \text{ weight loss} &= (W_i - W_t)/W_i * 100 \\ \% \text{ masa pierdută} &= (M_i - M_t)/M_i * 100\end{aligned}\quad (1)$$

where W_i is the initial weight and W_t is the weight after time t .

Deoarece utilizarea glutaraldehidei ca agent de reticulare este încă o problemă controversată în domeniul biomaterialelor, scopul acestui studiu este de a investiga concentrațiile corespunzătoare ale acesteia care pot fi utilizate în hidrogelul de colagen, fără efecte citotoxice și de a determina stabilitatea termică și enzimatică.

MATERIALE ȘI METODE

Gelurile de colagen tip I au fost obținute din piele bovină folosind protocolul descris anterior [1]. Gelul de colagen de 1,2% și pH-ul 2,5 a fost ajustat la pH 7,4 cu NaOH 1M. Gelul ajustat a fost reticulat cu procente diferite (între 0 și 1%) de glutaraldehidă (GA) de la Merck, Germania, turnat în vase Petri (3 cm diametru) și păstrat 24 de ore la 4°C pentru a obține hidrogeluri.

Colagenaza tip I, *C. histolyticum*, a fost achiziționată de la Sigma-Aldrich (SUA). Produsele chimice utilizate pentru culturile de celule au fost obținute de la Sigma (Germania). Godeurile pentru culturi au fost achiziționate de la Nunc (Germania). Linia de celule endoteliale umane, EA hy 926 (celule ombilicale venoase umane) a fost procurată de la American Type Cell Culture Collection (ATCC).

Măsurătorile spectrale FT-IR au fost determinate cu spectrofotometrul Jasco FT/IR-4200. Toate spectrele au fost înregistrate la următorii parametri: domeniu spectral 4000-510 cm^{-1} , rezoluție 4 cm^{-1} , 30 de achiziții pentru fiecare probă.

Măsurătorile de determinare a temperaturii de contractie au fost înregistrate cu ajutorul unei Micro plăci încălzite Caloris, cuplată cu un Stereomicroscop Leica. Intervalul de temperatură a fost 22-100°C, cu o viteză a încălzirii de 2°C/min.

Degradarea enzimatică a hidrogelurilor de colagen a fost investigată prin monitorizarea pierderii greutății în funcție de timpul de expunere în soluție de colagenază. Au fost cântărite cu precizie 2 g de hidrogel de colagen, apoi au fost introduse în soluția de PBS și în colagenază (1g/ml) și incubate la 37°C. La intervale regulate, structurile umflate au fost scoase din soluția de degradare, tamponate și cântărite. Procentul de degradare a hidrogelului a fost determinat de relația:

unde M_i este masa inițială și M_t este greutatea după timpul t .

For *in vitro* collagen hydrogels colonization, the human endothelial cell line, EA hy 926 (human umbilical vein cell line) was grown in DMEM culture medium containing 4.5% glucose supplemented with 10% fetal bovine serum, and antibiotics (100 U/l penicillin, 100 U/l streptomycin, 50 U/l neomycin). Collagen hydrogels were sterilized for 24 hours with 70% ethanol, conditioned in culture medium for 24 hours and inoculated with endothelial cells (50.000 cells/ml). The cells on hydrogels were maintained in culture at 37°C in incubators with 5% CO₂ in air and high relative humidity (>95%).

Hoechst staining

After one week in culture, the cells on collagen hydrogels were washed in PBS, fixed in 2% paraformaldehyde (one hour) and then cryoprotected. Specimens were frozen in liquid nitrogen and sectioned with a Leica CM 1800 cryotom. Cryosections were washed in PBS for 15 minutes, stained with Hoechst 33258 for 15 min, washed in distilled water, mounted in glycerol and examined with a Nikon microscope equipped with epi-fluorescence; the micrographs were captured with a Sony DSC-S75 Digital Camera [13].

RESULTS AND DISCUSSION

It is well-known that collagen as such is much more sensitive to enzyme degradation than cross-linked collagen, but at the same time the cross-linking agent could be cytotoxic in contact with cells. In this study we establish a balance between biocompatibility of collagen hydrogels with endothelial cells and their thermal and enzymatic stability.

Crosslinking is the process of chemically joining two or more molecules by a covalent bond. Figure 1 shows schematically the interaction of collagen with glutaraldehyde.

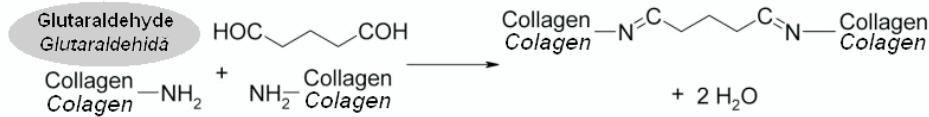


Figure 1. Cross-linking between collagen and glutaraldehyde

Figura 1. Reticularea între colagen și glutaraldehidă

Pentru colonizarea hidrogelurilor de colagen *in vitro*, linia de celule endoteliale umane, EA hy 926 (celule ombilicale venoase umane) a fost crescută în mediul de cultură care conține 4,5 % DMEM glucoză suplimentat cu 10% ser fetal bovin și antibiotice (100 U/l de penicilină, 100 U/l streptomycină, 50 U/l neomicină). Hidrogelurile de colagen au fost sterilizate timp de 24 de ore cu 70% etanol, condiționat în mediu de cultură pentru 24 de ore și inoculat cu celule endoteliale (50.000 celule/ml). Celulele din hidrogeluri au fost menținute în cultură, la 37°C, în incubatoare cu 5% CO₂, în aer și umiditate relativă mare (>95%).

Colorarea cu Hoechst

După o săptămână în cultură, celulele din hidrogelurile de colagen au fost spălate în PBS, stabilizate cu 2% paraformaldehidă (o oră) și apoi crioprotejate. Probele au fost înghețate cu azot lichid și secționate cu un criotom Leica CM 1800. Secțiunile criogenice au fost spălate în PBS timp de 15 minute, colorate cu Hoechst 33258 pentru 15 min., spălate în apă distilată, montate în glicerol și examinate cu un microscop Nikon dotat cu epifluorescență; micrografilele au fost captate cu un aparat foto digital Sony DSC-S75 [13].

RESULTATE ȘI DISCUȚII

Colagenul, ca atare, este mult mai sensibil la degradarea cu enzime decât cel reticulat, dar în același timp, agentul de reticulare poate fi citotoxic în contact cu celulele. În acest studiu s-a stabilit un echilibru între biocompatibilitatea hidrogelurilor de colagen cu celule endoteliale și stabilitatea lor termică și enzimatică.

Reticularea este procesul de legare chimică a două sau mai multe molecule printr-o legătură covalentă. Figura 1 prezintă schematic interacțiunea colagenului cu glutaraldehida.

In this work a collagen gel was cross-linked with 12 concentrations of GA (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0%) and collagen hydrogels with different cross-linking degrees were obtained. Figure 2 shows comparative images between an uncross-linked (Figure 2 a) and a cross-linked (Figure 2 b) collagen hydrogel.



Figure 2. Collagen hydrogels: a) uncross-linked and b) cross-linked with 0.8% GA

Figura 2. Hidrogeluri de colagen: a) ne-reticulat b) reticulat cu 0,8% GA

The cross-linking degree was also emphasised by thermal analysis, FT-IR spectroscopy, as well as enzymatic degradation.

Collagen hydrothermal stability is given by the shrinkage temperature, also called denaturation temperature, which measures the temperature of transition of collagen molecule conformation from triple helix to statistic coil [14].

Figure 3 shows the shrinkage temperature of collagen hydrogels depending on the GA contents. All the measurements were performed in triplicate.

În această lucrare gelul de colagen a fost reticulat cu 12 concentrații de GA (0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0%) și au fost obținute hidrogeluri de colagen cu diferite grade de reticulare. Figura 2 prezintă imagini comparative între un hidrogel de colagen nereticulat (Figura 2 a) și unul reticulat (Figura 2 b).

Gradul de reticulare a fost totodată evidențiat de analiza termică, de spectroscopia FT-IR, precum și de degradarea enzimatică.

Stabilitatea hidrotermică a colagenului este dată de temperatura de contractie, numită de asemenea temperatură de denaturare, care măsoară temperatura de tranziție a conformatiei moleculei de colagen de la triplul helix la ghem statistic [14].

Figura 3 prezintă temperatura de contractie pentru hidrogeluri de colagen în funcție de conținutul de GA. Toate măsurările au fost efectuate de trei ori.

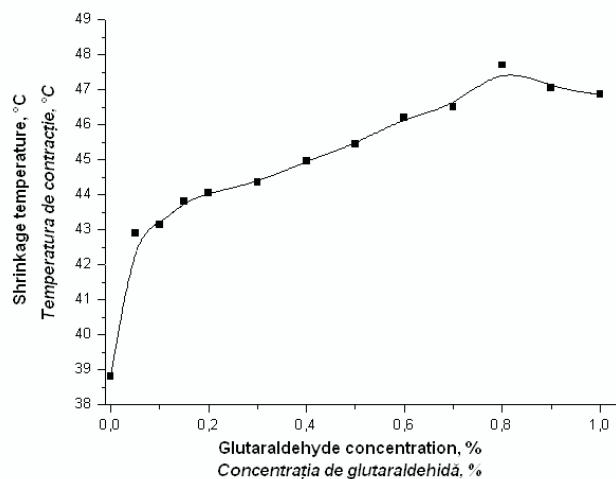


Figure 3. Shrinkage temperature depending on GA concentration

Figura 3. Variația temperaturii de contractie în funcție de concentrația de GA

As we can see in Figure 3, the difference between shrinkage temperature of the uncross-linked hydrogels and the cross-linked one with 0.05% GA is 4.1°C. Then, the shrinkage temperature increases slowly, almost linear with GA concentration increasing. The maximum temperature was recorded at 47.7°C for hydrogel cross-linked with 0.8% GA. Over this concentration, the shrinkage temperature not increased which demonstrated the maximum cross-linking degree at 0.8% GA. A higher concentration of cross-linking agent in these collagen hydrogels could remain un-reacted.

The FT-IR spectra for collagen hydrogels (Figure 4) show the characteristic peaks as follows: 3301 cm^{-1} (amide A), 1634 cm^{-1} (amide I), 1554 cm^{-1} (amide II) and 1241 cm^{-1} (amide III).

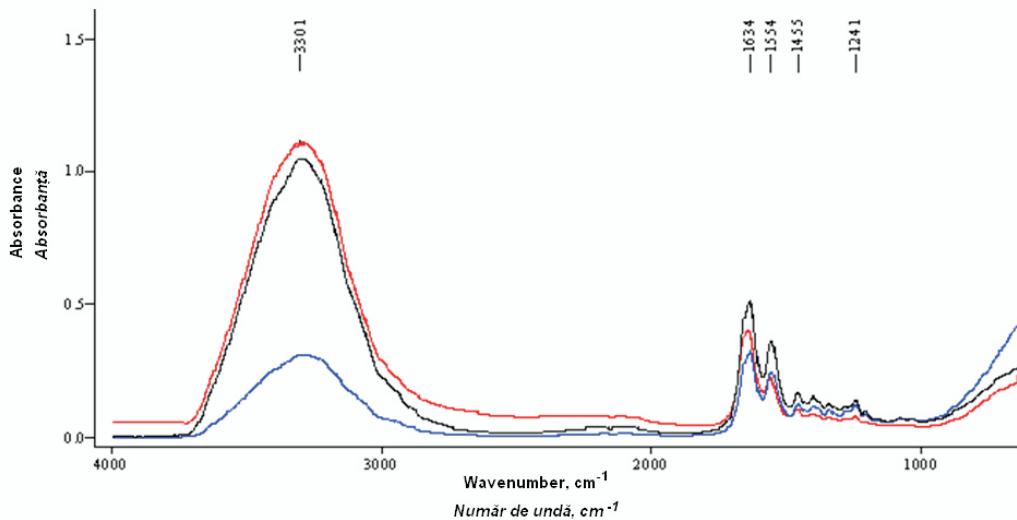


Figure 4. FT-IR spectra of collagen hydrogels: uncross-linked (red), cross-linked with 0.8% GA (blue) and with 1.0% GA (black)

Figura 4. Spectrele FT-IR pentru hidrogelurile de colagen: nereticulat (roșu), reticulat cu 0,8% GA (albastru), reticulat cu 1,0% GA (negru)

The amide I, II and III band region of the spectrum are directly related to the polypeptide conformation. The amide I (A_1) band, with a characteristic frequency in the range of 1600-1700 cm^{-1} , is mainly associated with the stretching vibrations of the carbonyl groups ($C=O$ bond) along the polypeptide backbone and is a sensitive marker of the peptide secondary structure [15]. The amide II, positioned at 1550 cm^{-1} , corresponds to a combination of the N-H in-plane bend and the C-H stretch vibrations [16]. For the amide III bands there are two bands assigned at 1241 and 1281 cm^{-1} . The amide

După cum se poate vedea în Figura 3, diferența dintre valoarea temperaturii de contractie a hidrogelurilor nereticulate și a celor reticulate cu 0,05%, GA este de 4,1°C. Creșterea valorii temperaturii de contractie crește lent aproape liniar cu creșterea concentrației de GA. Temperatura maximă a fost înregistrată la 47,7°C pentru hidrogelul reticulat cu 0,8% GA. Peste această concentrație, valoarea temperaturii de contractie nu a mai crescut, ceea ce a demonstrat un grad maxim de reticulare la 0,8% GA. O concentrare mai mare de agent de reticulare în aceste hidrogeluri de colagen ar putea rămâne nereacționată.

Spectrele FT-IR pentru hidrogelurile de colagen (Figura 4) prezintă maximele caracteristice, după cum urmează: 3301 cm^{-1} (amida A), 1634 cm^{-1} (amida I), 1554 cm^{-1} (amida II) și 1241 cm^{-1} (amida III).

Benzile spectrului amidei I, II și III sunt direct legate de conformația polipeptidă. Banda amidă I (A_1), cu o frecvență caracteristică în intervalul de 1600-1700 cm^{-1} , este în principal asociată cu vibrațiile elastice ale grupărilor carbonil (legături $C=O$) de-a lungul catenei principale a polipeptidei și reprezintă un marker sensibil al structurii secundare a peptidei [15]. Banda amidă II, poziționată la 1550 cm^{-1} , se datorează vibrației transversale puternice N-H cuplată cu vibrația de întindere C-N din grupa amidă [16]. Banda amidă III prezintă două benzi atribuite la 1241 și 1281 cm^{-1} .

III peaks corresponds to a combination of the C-N stretch and the N-H in-plane bends [17-19].

The amide A (A_A) bands were shifted during cross-linking process and the ratio A_I/A_A which is correlated with the cross-linking degree (the higher the A_I/A_A ratio, the more advanced the cross-linking degree) is presented in Figure 5 depending on GA concentrations.

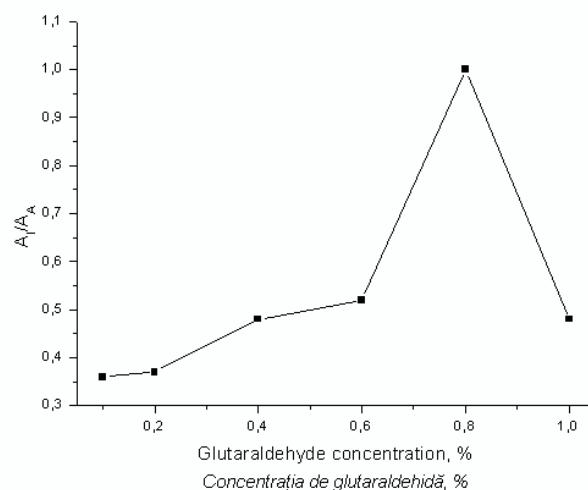


Figure 5. The influence of GA concentration on A_I/A_A ratio
Figura 5. Influența concentrației de GA asupra raportului A_I/A_A

The values of the ratio A_I/A_A obtained for the hydrogels demonstrate the strongest cross-linking when GA concentration is 0.8%, result also sustained by the thermal analyses.

The cross-linking reaction between free amino groups of lysine or hydroxylysine from the polypeptidic chain of collagen and aldehyde groups of glutaraldehyde is given by shifting of amide I from 1641 cm^{-1} in uncross-linked collagen to 1633 cm^{-1} in collagen cross-linked with 0.8% GA.

In order to simulate the behavior of hydrogels in *in vivo* conditions and to notice the biological stability, we performed *in vitro* degradation by collagenase. Among all the enzymes, only collagenase is able to cleave collagen completely. The hydrogels were tested by collagenase degradation according with the protocol previously described in Materials and Methods section. The reference hydrogel (uncross-linked) and the ones cross-linked with 0.05-0.15% were completely digested after 2 hours. The other cross-linked hydrogels were digested at different times depending on cross-linking degree, as Figure 6 shows.

Benzile amidei III se datorează vibrațiilor C-N de întindere și N-H de deformare [17-19].

Benzile amidei A (A_A) s-au deplasat în timpul procesului de reticulare, iar raportul A_I/A_A care este corelat cu gradul de reticulare (cu cât este mai mare raportul A_I/A_A , cu atât este mai puternic gradul de reticulare) este prezentat în Figura 5, în funcție de concentrațiile de GA.

Valorile raportului A_I/A_A obținute pentru hidrogeluri demonstrează o reticulare mai puternică, atunci când concentrația de GA este de 0.8%, rezultat susținut de asemenea și de analizele termice.

Reacția de reticulare între grupările amino libere ale lizinei sau hidroxilizinei din lanțul polipeptidic al colagenului și grupările aldehidice ale glutaraldehydei este dată de deplasarea benzii corespunzătoare amidei I de la 1641 cm^{-1} în colagenul nereticulat la 1633 cm^{-1} în colagenul reticulat cu 0.8% GA.

Pentru a simula comportamentul hidrogelurilor în condiții *in vivo* și pentru a observa stabilitatea biologică s-a efectuat o degradare *in vitro* cu collagenază. Dintre toate enzimele, doar collagenaza este capabilă de a cliva complet colagenul. Hidrogelurile au fost testate prin degradare cu collagenază, în conformitate cu protocolul descris în secțiunea Materiale și metode. Hidrogelul de referință (nereticulat) și cel reticulat cu 0,05 până la 0,15%, au fost complet degradate după 2 ore. Celelalte hidrogeluri reticulate au fost degradate la momente diferite, în funcție de gradul de reticulare, după cum arată Figura 6.

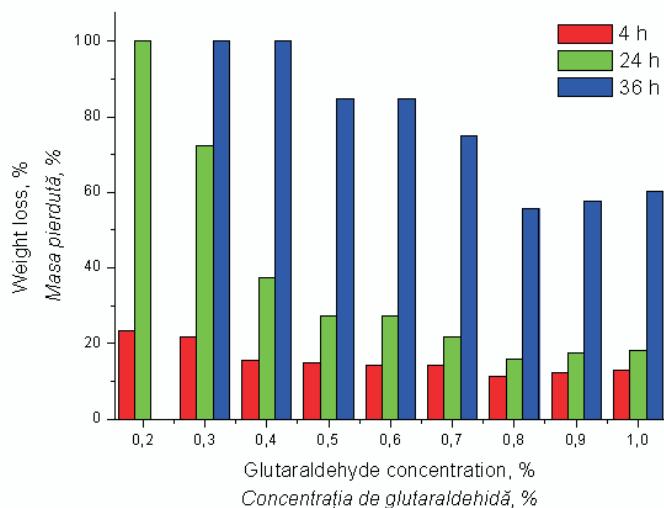


Figure 6. *In vitro* enzymatic degradation of collagen hydrogels
Figura 6. Degradarea enzimatică *in vitro* a hidrogelurilor de colagen

As we can notice in Figure 6 the hydrogels were degraded 13-24% in the first 4 hours. A total digestion was performed after 24 hours for hydrogel cross-linked with 0.2% GA and after 36 hours for hydrogels cross-linked with 0.3 and 0.4% GA. The most biologically stable hydrogel was the one cross-linked with 0.8% GA, as the FT-IR and thermal analysis showed.

One of the main properties of a hydrogel to be scaffold for tissue engineering is biocompatibility with cells. Because most hydrogels are used as wound dressing for recovery of damaged tissue, we test the biocompatibility of obtained hydrogels with endothelial cells.

Figure 7 shows endothelial cells after 2 days of seeding near the hydrogels.

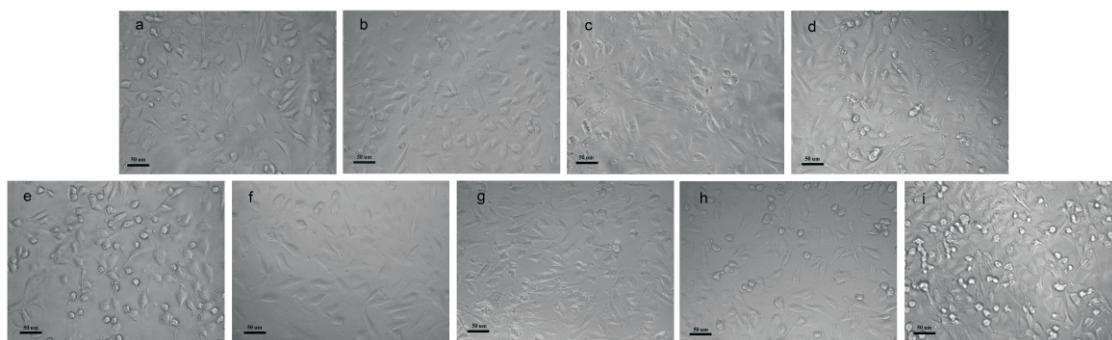


Figure 7. Endothelial cells growth near hydrogels:

a – 0,2, b – 0,3, c – 0,4, d – 0,5, e – 0,6, f – 0,7, g – 0,8, h – 0,9 and i – 1,0% GA

Figura 7. Celule endoteliale crescute lângă hidrogeluri:

a – 0,2, b – 0,3, c – 0,4, d – 0,5, e – 0,6, f – 0,7, g – 0,8, h – 0,9 și i – 1,0% GA

După cum se poate observa în Figura 6, hidrogelurile au fost degradate în proporție de 13-24% în primele 4 ore. O degradare totală a fost efectuată după 24 de ore pentru hidrogelul reticulat cu 0,2% GA și după 36 de ore pentru hidrogelurile reticulate cu 0,3 și 0,4% GA. Analizele FT-IR și analiza termică au arătat că cel mai stabil hidrogel a fost cel reticulat cu 0,8% GA.

Una dintre principalele proprietăți ale unui hidrogel pentru a fi suport pentru ingineria tisulară este biocompatibilitatea cu celulele. Deoarece cele mai multe hidrogeluri sunt folosite ca pansamente de refacere a țesutului deteriorat, s-a testat biocompatibilitatea hidrogelurilor obținute cu celule endoteliale.

Figura 7 prezintă celule endoteliale la 2 zile de la înșămânțare, lângă hidrogeluri.

As we expected from biological degradation tests, the weakly crosslinked hydrogels were dissolved in medium culture starting with the second day.

Endothelial cells which remain in collagen hydrogels until the seventh day were analyzed in cryosections through optic and fluorescence microscopy, as we can see in Figure 8.

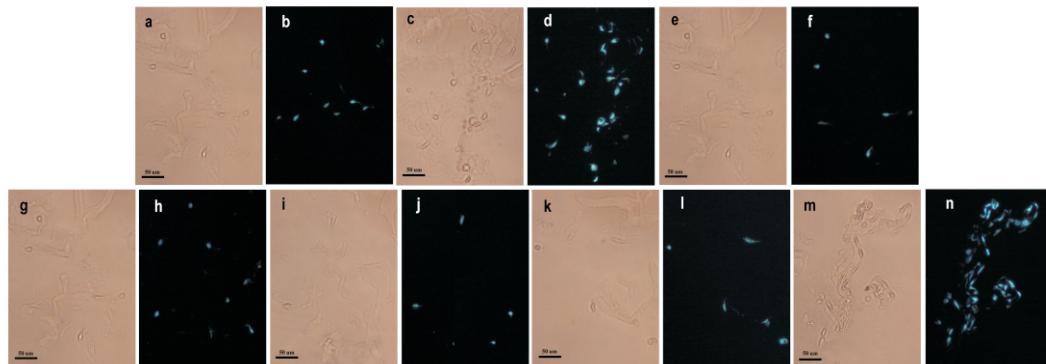


Figure 8. Endothelial cells cultured on hydrogels cross-linked with:
a, b) 0.4%; c, d) 0.5%; e, f) 0.6%; g, h) 0.7%; i, j) 0.8%; k, l) 0.9%; m, n) 1.0% GA;
left – phase contrast, right – Hoechst staining

Figura 8. Culturi de celule endoteliale în hidrogeluri reticulare cu:
a, b) 0,4%; c, d) 0,5%; e, f) 0,6%; g, h) 0,7%; i, j) 0,8%; k, l) 0,9%; m, n) 1,0% GA;
stânga – contrast de fază, dreapta – colorare cu Hoechst

The images presented in Figure 8 show that if the concentration of cross-linking agent from hydrogels is lower than 1%, collagen hydrogels are biocompatible with endothelial cells. If the concentration is very low, the hydrogels are not stable and they are dissolved in medium culture.

CONCLUSIONS

The thermal and enzymatic stability of some collagen hydrogels were performed. An increase of cross-linking degree of collagen slowed down their degradation and increased thermal stability with over 9°C. The most stable hydrogel was proved the one cross-linked with 0.8% glutaraldehyde. The hydrogels cross-linked with 0-0.15% GA were digested in about 2 hours and were dissolved in culture medium during the 7 days. The hydrogels cross-linked with 0.4-1.0% did not show any cytotoxic effect in contact with endothelial cells. In conclusion, the hydrogel with 1.2% collagen and 0.8% GA could be a basic promising

Așa cum era de așteptat din testele de degradare biologică, hidrogelurile slab reticulate au fost dizolvate în mediu de cultură începând cu a doua zi.

Celulele endoteliale care au rămas în hidrogelurile de colagen până într-a săptea zi au fost analizate prin secțiuni criogenice folosind microscopia optică și de fluorescență, așa cum se observă în Figura 8.

Imaginile prezentate în Figura 8 arată că, în cazul în care concentrația agentului de reticulare din hidrogeluri este mai mică de 1%, hidrogelurile de colagen sunt biocompatibile cu celulele endoteliale. În cazul în care concentrarea este foarte scăzută, hidrogelurile nu sunt stabile și se dizolvă în mediu de cultură.

CONCLUZII

Au fost determinate stabilitatea termică și cea enzimatică a unor hidrogeluri de colagen. O creștere a gradului de reticulare a colagenului încetinește degradarea acestora și mărește stabilitatea termică cu peste 9°C. Hidrogelul cel mai stabil a fost cel reticulat cu 0,8% glutaraldehidă. Hidrogelurile reticulare cu 0-0,15% GA au fost degradate în aproximativ 2 ore și s-au dizolvat în mediul de cultură în timpul celor 7 zile de cultivare. Hidrogelurile reticulare cu 0,4-1,0%, nu au prezentat niciun efect citotoxic în contact cu celulele endoteliale. În concluzie, hidrogelul cu 1,2% colagen și 0,8% GA ar putea fi un biomaterial de bază promițător

biomaterial for tissue engineering and drug delivery systems.

Acknowledgements

This work was supported by CNCSIS – UEFISCDI, project number PNII – PARTENERIATE code 62092/2008. One of the authors (I.T.) acknowledges the financial support of European Social Fund – „Cristofor I. Simionescu” Postdoctoral Fellowship Programme ID POSDRU/89/1.5/S/55216), Sectoral Operational Programme Human Resources Development 2007-2013.

pentru ingineria tisulară și pentru sistemele de cedare a medicamentelor.

Mulțumiri

Această lucrare a fost finanțată de CNCSIS-UEFISCDI, proiect PNII – PARTENERIATE, cod 62092/2008. Unul dintre autori (I.T.) dorește să mulțumească pentru sprijinul financiar al Fondului Social European – Programul de burse postdoctorale „Cristofor I. Simionescu” ID POSDRU/89/1.5/S/55216), Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013.

REFERENCES

1. Albu, M.G., Ficai, A., Lungu, A., *Revista de Pielărie Încălțăminte (Leather and Footwear Journal)*, **2010**, 10, 3, 39-50.
2. Pourjavadi, A., Kurdtabar, M., *Eur. Polym. J.*, **2007**, 43, 877-889.
3. Badiger, M.V., McNeil, M.E., Graham, N.B., *Biomaterials*, **1993**, 14, 1059-1063.
4. Ramazani-Harandi, M.J., Zohuriaan-Mehr, M.J., Yousefi, A.A., Ershad-Langroud, A., Kabiri, K., *Polym. Test*, **2006**, 25, 470-474.
5. Pourjavadi, A., Kurdtabar, M., Mahdavinia, G.R., Hosseinzadeh, H., *Polym. Bull.*, **2006**, 57, 813-824
6. Satarkar, N.S., Hilt, J.Z., *Acta Biomater.*, **2008**, 4, 11-16.
7. Spiller, K.L., Laurencin, S.J., Charlton, D., Maher, S.A., Lowman, A.M., *Acta Biomater.*, **2008**, 4, 17-25.
8. Valenta, C., Auner, B.G., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2004**, 58, 279-289.
9. Ratner, B.D., Biomedical Applications of Hydrogels: Review and Critical Appraisal in: Williams D.F., ed., *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*, II. Boca Raton, FL: CRC Press, **1981**, 146.
10. Friess, W., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **1998**, 45, 113-136.
11. Tsai, C.C., Huang, R.N., Sung, H.W., Liang, H.C., *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, 52, 58-65.
12. Chang, Y., Tsai, C.C., Liang, H.C., Sung, H.W., *Biomaterials*, **2002**, 23, 2447-2457.
13. Titorencu, I., Albu, M.G., Giurginca, M., Jinga, V., Antoniac, I., Trandafir, V., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **2010**, 523, 82-96.
14. Park, J.B., *Biomaterials: Principles and Application*, CRC Press, Boca Raton, **2002**.
15. Hristov, V., Radev, L., Samunova, B., Apostolov, G., *Cent. Eur. J. Chem.*, **2009**, 7, 4, 702-710.
16. Chang, M., Tanaka, J., *Biomaterials*, **2002**, 23, 4811-4818.
17. Sachlos, E., Wahl, D.A., Triffitt, J.T., Czernuszka, J.T., *Acta Biomater.*, **2008**, 4, 1322-1331.
18. Radev, L., Hristov, V., Samunova, V., Ivanova, D., *Cent. Eur. J. Chem.*, **2009**, 7, 4, 711-720.
19. Chang, M., Ko, C., Douglas, W., *Biomaterials*, **2003**, 24, 2853-2862.