

THE ACTIVITY OF SOME ENZYMES ON TYPE I FIBRILLAR COLLAGEN

ACTIVITATEA UNOR ENZIME ASUPRA COLAGENULUI FIBRILAR TIP I

Madalina Georgiana ALBU^{1,2*}, Mariana FERDES², Maria GIURGINCA², Ciprian CHELARU³, Rodica CONSTANTINESCU³, Mihaela Violeta GHICA⁴

¹University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Cluj-Napoca, 3-5 Manastur St., Cluj-Napoca, Romania, email: albu_mada@yahoo.com

²"Politehnica" University of Bucharest, Bucharest, 313 Spl. Independenței, sector 4, Bucharest, Romania, email: marianaferdes@yahoo.com

³INCDTP – Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu St., 031215, Bucharest, Romania, email: chelaru_cciprian@yahoo.com

⁴Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, 6 Traian Vuia St., Bucharest, Romania, email: mihaelaghica@yahoo.com

THE ACTIVITY OF SOME ENZYMES ON TYPE I FIBRILLAR COLLAGEN

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the *in vivo* enzymatic biodegradation of cross-linked and uncross-linked collagen sponges. For this reason the influence of enzymes (collagenase, pepsin, trypsin and papain) was performed on the designed sponges. Collagen hydrolysates as biodegradation results were investigated using FT-IR analysis and kinetic method. The strongest effect of degradation on sponges was recorded for collagenase. The best resistance to biodegradation was obtained for the cross-linked collagen matrices. The results of the enzymatic biodegradation were correlated with FT-IR spectra and kinetic data from enzymatic biodegradation.

KEY WORDS: collagen, biodegradation, enzymes.

ACTIVITATEA UNOR ENZIME ASUPRA COLAGENULUI FIBRILAR TIP I

REZUMAT. Scopul acestui studiu îl reprezintă evaluarea biodegradării enzimatică *in vivo* pentru bureți de colagen reticulați și nereticulați. Pentru aceasta a fost studiată influența unor enzime (colagenaza, pepsina, tripsina și papaina) asupra burețiilor de colagen. Hidrolizatul de colagen ca rezultat al biodegradării a fost investigat folosind analiza FT-IR și metoda cinetică. Cel mai puternic efect al degradării asupra burețiilor a fost înregistrat pentru colagenază. Cea mai bună rezistență la biodegradare a fost obținută pentru matricile de colagen reticulat. Rezultatele biodegradării enzimatică au fost corelate cu spectrele FT-IR și cu datele cinetice de biodegradare enzimatică.

CUVINTE CHEIE: colagen, biodegradare, enzime.

L'ACTIVITÉ DES ENZYME SUR LE COLLAGÈNE FIBRILLAIRE DE TYPE I

RÉSUMÉ. Le but de cette étude est d'évaluer *in vivo* la biodégradation enzymatique des éponges de collagène réticulés et non-réticulés. À cette fin on a étudié l'influence d'enzymes (la collagénase, la pepsine, la trypsine et la papaïne) sur les éponges de collagène. Le hydrolysat de collagène comme résultat de la biodégradation a été étudié par l'analyse FT-IR et par la méthode cinétique. L'effet le plus fort de la dégradation sur les éponges a été enregistré pour la collagénase. La meilleure résistance à la biodégradation a été obtenue pour les matrices de collagène réticulé. Les résultats de la biodégradation enzymatique ont été corrélés avec les spectres FT-IR et les données cinétiques de la biodégradation enzymatique.

MOTS CLÉS: collagène, dégradation, enzymes.

INTRODUCTION

Collagen-based biomaterials are widely used in reconstructive medicine, pharmacy and cosmetics [1]. Due to its excellent properties, collagen can be processed in different forms as burn/wound dressings, osteogenic and bone filling materials, antithrombogenic surfaces, collagen shields in ophthalmology and it has

INTRODUCERE

Biomaterialele pe bază de colagen sunt utilizate pe scară largă în medicina reconstrucțivă, în farmacie și în industria cosmetică [1]. Datorită proprietăților sale excelente, colagenul poate fi prelucrat în diferite forme, cum ar fi pansamente pentru arsuri/lezuni, materiale osteogenice și de umplutură a oaselor, suprafețe antitrombogenice, lentile de colagen în

* Correspondence to: Madalina Georgiana ALBU, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Cluj-Napoca, 3-5 Manastur St., Cluj-Napoca, Romania, email: albu_mada@yahoo.com

also been used for tissue engineering including skin replacement, bone substitutes, and artificial blood vessels and valves [2].

In order to obtain collagen biomaterials with proper mechanical properties, several methods of cross-linking and sterilization can be used [3]. Cross-linking leads to the formation of supplementary chemical bonds among collagen molecules and/or fibrils, increasing the mechanical and chemical stability and thus decreasing the biodegradability. Chemical cross-linking consists in collagen reaction with aldehydes, diisocyanates, carboimides, acyl-azide, polyepoxydes and polyphenolic compounds which leads to the formation of ionic or covalent bonds between molecules and fibrils.

Glutaraldehyde (GA) is one of the most used cross-linking agents due to its great efficiency in stabilization of collagen biomaterials. Cross-linking with GA involves reactions of aldehyde groups with the free ϵ -amino groups of lysine or hydroxylysine from the polypeptide chains [4].

Numerous proteases may be present at the wound site and catalyze the hydrolysis of polypeptides [5]. For this reason, investigation of degradative process which occurs in the human body is needed. In the present investigation, collagenase, pepsin, trypsin and papain were selected to simulate *in vivo* hydrolysis of collagen sponges.

Collagenases are enzymes capable of cleaving native collagen molecules through their characteristic helical portion. Almost all collagenases are also capable of degrading collagen molecules that have been stabilized into fibrils under physiologic conditions [6]. Enzymes such as trypsin are not considered collagenases, since they only degrade an end of the native collagen molecule. Other non-specific proteinases, such as pepsin, can only attack telopeptides or denatured helical regions. This makes them responsible for farther degradation to amino acids [7].

In this work we studied behavior of different enzymes (collagenase, pepsin, trypsin and papain) on cross-linked and uncross-linked collagen sponges in order to simulate *in vivo* biodegradation. The results of

oftalmologie, fiind, de asemenea, utilizat în inginieria tisulară, inclusiv ca înlocuitor de piele, înlocuitor de os, precum și pentru vase de sânge și valve artificiale [2].

Pentru a obține biomateriale de colagen cu proprietăți mecanice corespunzătoare se pot utiliza mai multe metode de reticulare [3]. Reticularea duce la formarea de legături chimice suplimentare între moleculele și/sau fibrile de colagen, mărzind stabilitatea mecanică și chimică și reducând astfel biodegradabilitatea. Reticularea chimică presupune reacția colagenului cu aldehide, diizocianați, carboimide, acil-azide, compuși poliepoxizi și polifenolici care conduc la formarea legăturilor ionice sau covalente între molecule și fibrile.

Glutaraldehida (GA) este unul dintre cei mai utilizați agenți de reticulare datorită eficienței sale în stabilizarea biomaterialelor colagenice. Reticularea cu GA implică reacții ale grupărilor aldehidice cu grupările libere ϵ -amino de lizină sau hidroxilizină din lanțurile polipeptidice [4].

Numeroase proteaze pot fi prezente în zona leziunilor, catalizând hidroliza polipeptidelor [5]. Din acest motiv este necesară investigarea procesului de degradare care are loc în corpul uman. În cadrul prezentei investigații s-au ales colagenaza, pepsina, papaina și tripsina pentru a simula hidroliza *in vivo* a burețiilor de colagen.

Colagenazele sunt enzime care pot cliva moleculele native de colagen prin intermediul portiunii lor elicoidale caracteristice. Aproape toate colagenazele sunt, de asemenea, capabile să degradeze moleculele de colagen care au fost stabilizate în fibrile în condiții fiziologice [6]. Enzime precum tripsina nu sunt considerate colagenaze, deoarece degradează doar un capăt al moleculei native de colagen. Alte non-proteinaze specifice, cum ar fi pepsina, pot ataca doar telopeptidele sau regiunile elicoidale denaturate. Acest lucru le face responsabile de degradarea ulterioară a aminoacicilor [7].

În această lucrare s-a studiat comportamentul diferitelor enzime (colagenază, pepsină, tripsină și papaină) pe bureți de colagen reticulați și nereticulați, pentru a simula biodegradarea *in vivo*. Rezultatele

biodegradation process were investigated by FT-IR and kinetics of *in vivo* degradation with enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Type I collagen gels were obtained from bovine hide using the protocol that has been previously described [4]. The initial gel of 2.11% collagen and pH 2.5 was adjusted at 1.2% collagen and 7.4 pH with 1M NaOH and distilled water. The adjusted gel was cross-linked with 0.5% glutaraldehyde (GA) from Merck, Germany, cast in Petri dishes (1 cm diameter) and kept 24 h at 40°C in refrigerator and than lyophilized with Delta 2-24 LSC Martin Christ (Germany) freeze-dryer by the previously described program [8]. Cross-linked and uncross-linked collagen matrices were obtained.

Collagenase from *Clostridium histolyticum*, pepsin from porcine gastric mucosa, trypsin from bovine pancreas and papain from *Carica papaya* were purchased from Sigma, Germany.

Enzymatic degradation of collagen scaffolds was investigated by monitoring the mass loss of porous matrices as function of exposure over time to enzymatic solution (1 μ g/mL). At regular intervals, the swollen scaffolds were removed from the enzymatic solution, wiped and weighed. The percent of degradation of matrices was determined by the following formula:

$$\begin{aligned} \text{\% weight loss} &= (W_i - W_t)/W_i * 100 \\ \text{\% pierdere de greutate} &= (W_i - W_t)/W_i * 100 \end{aligned} \quad (1)$$

where W_i is the initial weight and W_t is the weight after time t . Each biodegradation experiment was repeated three times and the average values were used as the percentage of biodegradation.

FT-IR spectral measurements were recorded by Jasco FT/IR-4200 spectrophotometer. 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 between 22 and 100°C with a heating rate of 2°C/min by the micro-hot-table technique with a Micro Hot Table - Caloris in co-work with a Leica Stereomicroscope.

procesului de biodegradare au fost investigate prin FT-IR și cinetică a degradării *in vivo* cu enzime.

MATERIALE ȘI METODE

Gelurile de colagen de tip I au fost obținute din piei bovine utilizând protocolul descris anterior [4]. Gelul initial cu 2,11% colagen și pH de 2,5 a fost ajustat la 1,2% colagen și pH 7,4 cu 1M NaOH și apă distilată. Gelul ajustat a fost reticulat cu 0,5% glutaraldehidă (GA) de la Merck, Germania, turnat în vase Petri (1 cm diametru) și menținut 24 de ore la 4°C în frigider și apoi liofilizat utilizând liofilizatorul Delta 2-24 LSC Martin Christ (Germania) și programul descris anterior [8]. S-au obținut astfel matricile de colagen reticulate și nereticulate.

Colagenaza din *Clostridium histolyticum*, pepsina din mucoasa gastrica porcină, tripsina din pancreasul bovin și papaina din *Carica papaya* au fost achiziționate de la Sigma, Germania.

Degradarea enzimatică a unui suport de colagen a fost analizată prin controlul pierderii de masă a matricelor poroase ca funcție de expunere în timp față de soluția enzimatică (1 μ g/mL). La intervale regulate, matricile au fost îndepărtate din soluția enzimatică, uscate și cântărite. Procentul de degradare al matricilor a fost determinat prin folosirea următoarei formule:

unde W_i este greutatea inițială și W_t este greutatea după timpul t . Fiecare experiment de biodegradare a fost efectuat de trei ori și valoarea medie a fost folosită ca procent de biodegradare.

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

Măsurările temperaturii de contractie au fost înregistrate în intervalul 22-100°C cu o viteză de încălzire de 2°C/min utilizând dispozitivul Micro Hot Table - Caloris cuplat cu un Stereomicroscop Leica.

Enzymatic degradation of collagen matrices was investigated by monitoring the weight loss depending on exposure time to collagenase solution using the previously described methods [9].

RESULTS AND DISCUSSION

Two types of scaffolds based on collagen were obtained in this study: an uncross-linked and a cross-linked one. The FT-IR spectra for the scaffolds are presented in Figure 1.

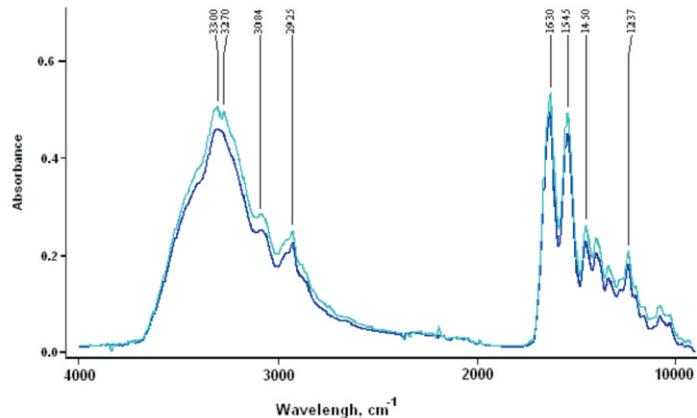


Figure 1. Cross-linked and uncross-linked collagen matrices

(— cross-linked sponge, — uncross-linked sponge)

Figura 1. Matrici colagenice reticulare și nereticulante

(— burete reticulat, — burete nereticulat)

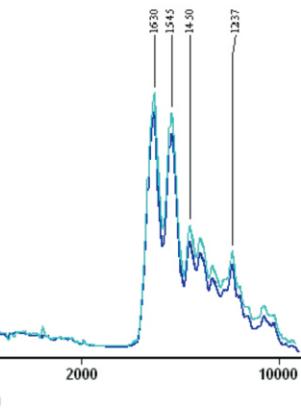
The secondary structure of collagen is given by amide I, amide II and amide III bands. The exact frequencies of these stretching vibrations for amide I depend upon the strength of the hydrogen bond to the carbonyl oxygen [10]. The FT-IR spectra showed amide band viz. I, II, and III in the region of 1600–1660 cm^{-1} , 1510–1560 cm^{-1} and 1220–1320 cm^{-1} . Amide I showed peak at 1630 cm^{-1} , amide II at 1545 cm^{-1} and amide III at 1237 cm^{-1} . The difference between samples could be seen only in amide A. The cross-linked samples present a smaller area than the uncross-linked ones, which demonstrated the cross-linking.

Shrinkage temperature of uncross-linked sample was 39°C, while the cross-linked one was 45°C.

Degradarea enzimatică a matricilor de colagen a fost investigată prin monitorizarea pierderii în greutate, în funcție de timpul de expunere la soluția de colagenază utilizând metodele descrise anterior [9].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În acest studiu s-au obținut două tipuri de suporturi pe bază de colagen: unul reticulat și unul nereticulat. Spectrele FT-IR pentru aceste suporturi sunt prezentate în Figura 1.



Structura secundară a colagenului este dată de benzile amidă I, amidă II, și amidă III. Frecvențele vibrațiilor de întindere pentru amida I depind de rezistența legăturii de hidrogen [10]. Spectrele FT-IR prezintă banda amidă I, II, III în regiunea 1600–1660 cm^{-1} , 1510–1560 cm^{-1} și 1220–1320 cm^{-1} . Amida I a prezentat un pic la 1630 cm^{-1} , amida II la 1545 cm^{-1} și amida III la 1237 cm^{-1} . Diferența dintre probe s-a putut vedea doar la amida A. Probele reticulante prezintă arie mai mică decât cele nereticulante, ceea ce demonstrează reticularea.

Temperatura de contractie a probei nereticulante a fost de 39°C, iar cea a probei reticulante, 45°C.

All the samples (cross-linked and uncross-linked ones) were degraded by collagenase, pepsin, trypsin and papain. All the experiments were performed in triplicate. Figure 2 a and b shows kinetic degradation over time of collagen matrices.

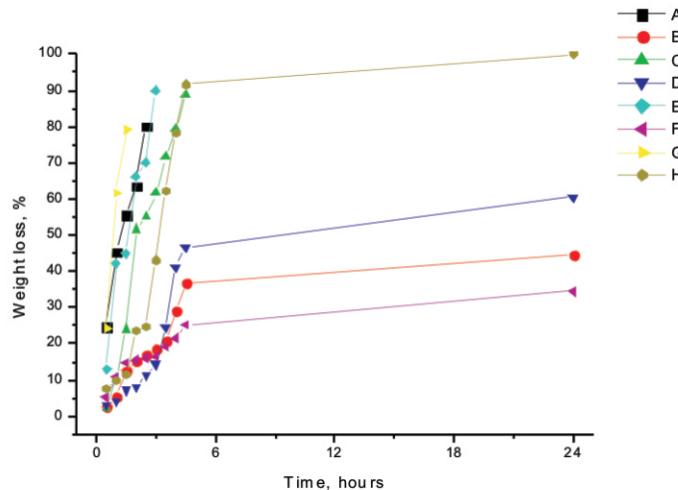


Figure 2. Weight loss of the a) uncross-linked matrices degraded with:
A – papain; C – pepsin; E – trypsin and G – collagenase and b) cross-linked matrices
degraded with: B – papain; D – pepsin; F – trypsin and H – collagenase
Figura 2. Pierdere de greutate pentru a) matrici ne-reticulate, degradate cu:
A – papaină; C – pepsină; E – tripsina și G – colagenază și b) matrici reticulate,
degradate cu: B – papaină; D – pepsină; F – tripsină și H – colagenază

As we can see in Figure 2, the uncross-linked samples were degraded in 2-3 hours by all the used enzymes, while after 24 hours the cross-linked samples were degraded 100% by collagenase, 60.5% by pepsin, 44.4% by papain and 34.5% by trypsin.

After 24 hours the degraded samples were frozen in order to stop the degradation process and then they were freeze-dried under the same conditions described in Materials and Methods. The degraded matrices in form of hydrolysates were studied by FT-IR spectroscopy.

Figure 3 shows FT-IR spectra of the enzymes used in this study.

Toate probele (reticulate și nereticulate) au fost degradate de colagenază, pepsină, tripsină și papaină. Toate experimentele au fost efectuate de trei ori. Figura 2 a și b arată degradarea cinetică în timp a matricilor de colagen.

După cum se poate observa în Figura 2, probele nereticulate au fost degradate total după un timp de 2-3 ore, prin acțiunea tuturor enzimelor, în timp ce după 24 de ore, probele reticulate au fost degradate în proporție de 100% de către colagenază, 60,5% de către pepsină, 44,4% de către papaină și 34,5% de către tripsină.

După 24 de ore, probele degradate au fost congelate pentru a opri procesul de degradare și apoi au fost liofilizate în aceleași condiții descrise în secțiunea Materiale și metode. Matricile degradate până la hidrolizare au fost studiate prin spectroscopia FT-IR.

Figura 3 prezintă spectrele FT-IR ale enzimelor utilizate în acest studiu.

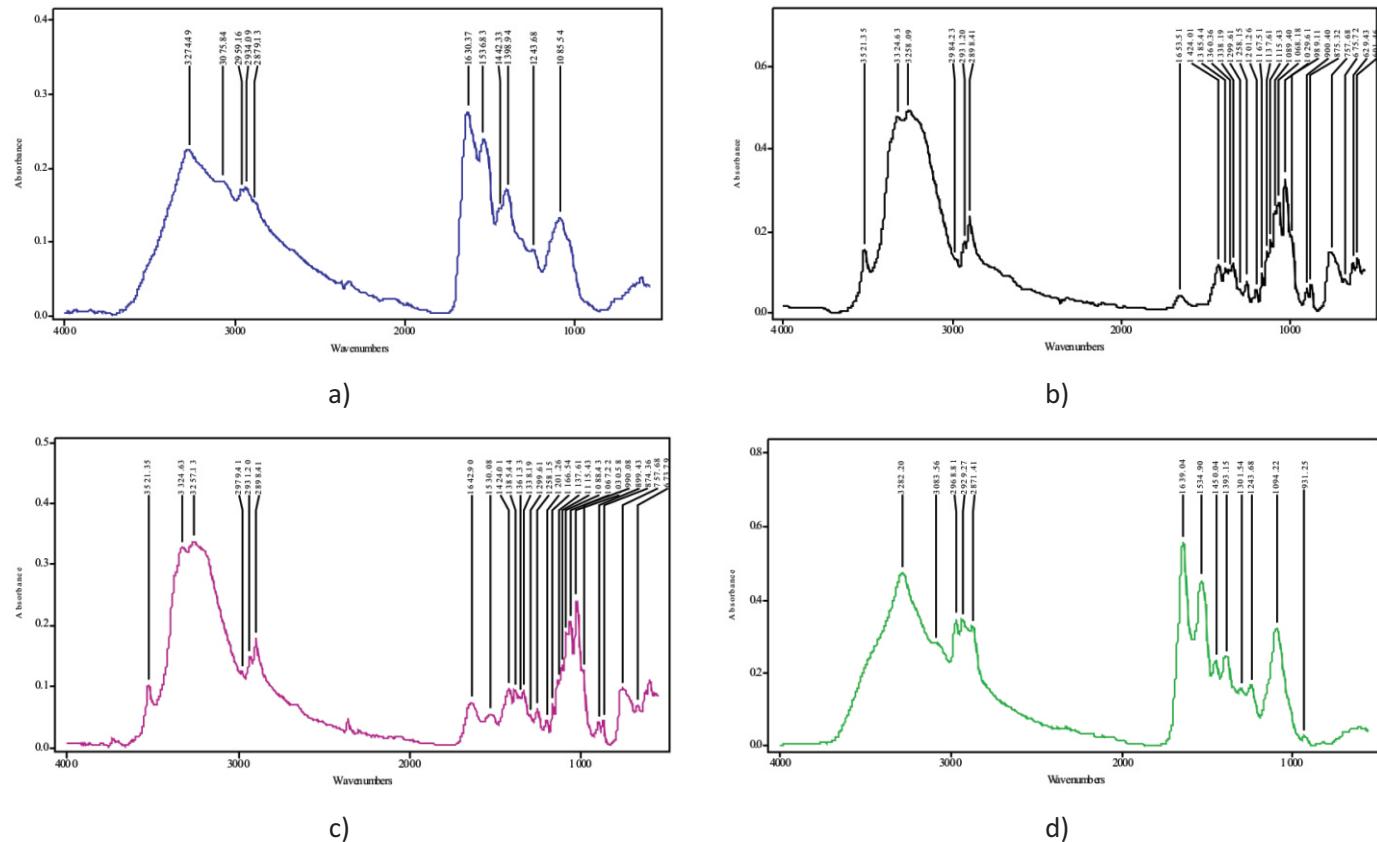
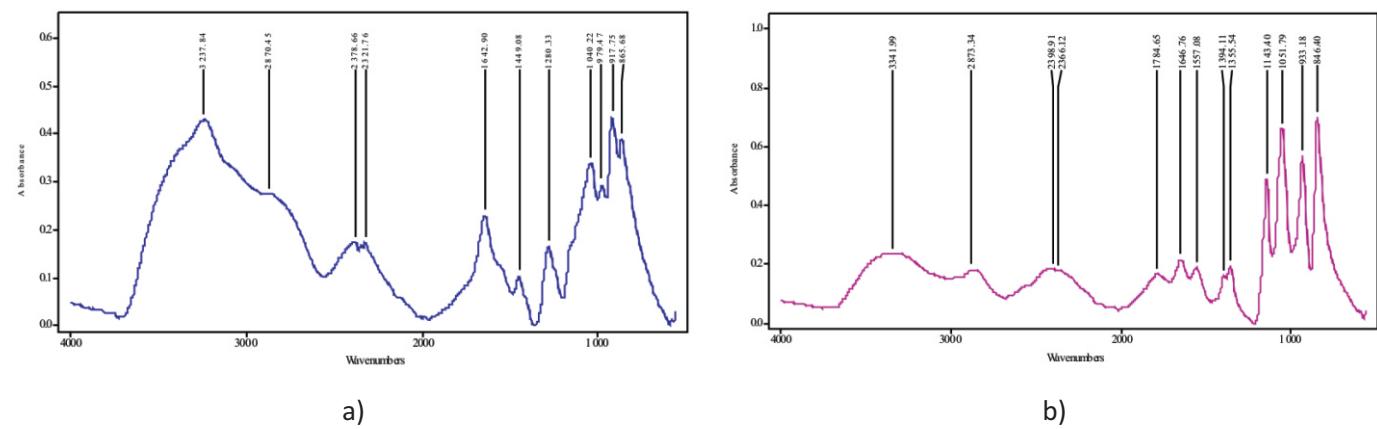


Figure 3. FT-IR spectra of a) papain; b) trypsin; c) pepsin; d) collagenase
 Figura 3. Spectrele FT-IR ale a) papainei; b) tripsinei; c) pepsinei; d) colagenazei

Figures 4 and 5 show FT-IR spectra of uncross-linked and cross-linked collagen matrices respectively, degraded by enzymes.

Figurile 4 și 5 prezintă spectrele FT-IR ale matricilor de colagen nereticulate și reticulate, degradate cu enzime.



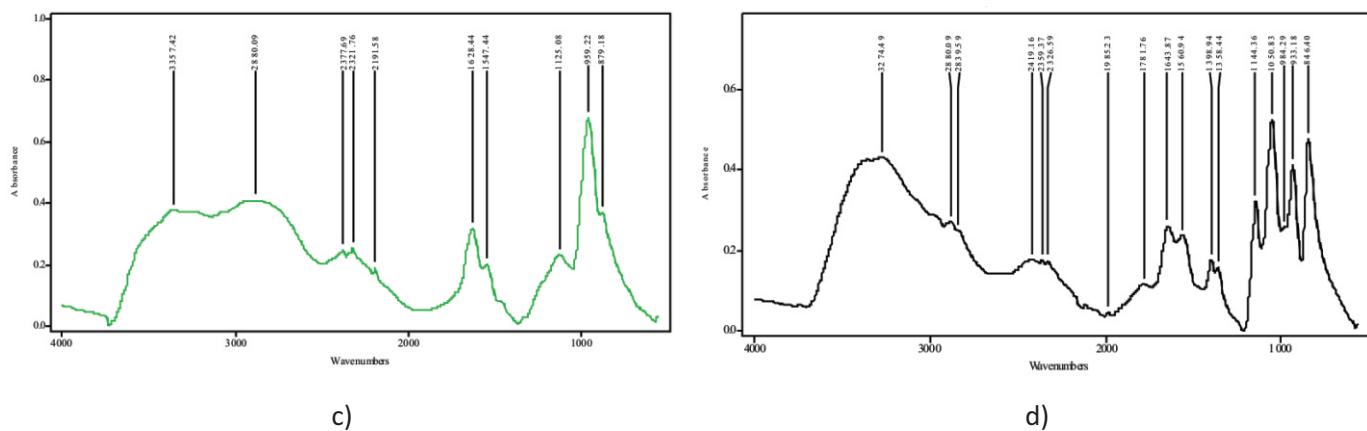


Figure 4. FT-IR spectra of uncross-linked collagen matrices degraded with:
a) papain; b) trypsin; c) pepsin; d) collagenase

Figura 4. Spectrele FT-IR ale matricilor de colagen nereticulate degradate cu:
a) papaină; b) tripsină; c) pepsină; d) colagenază

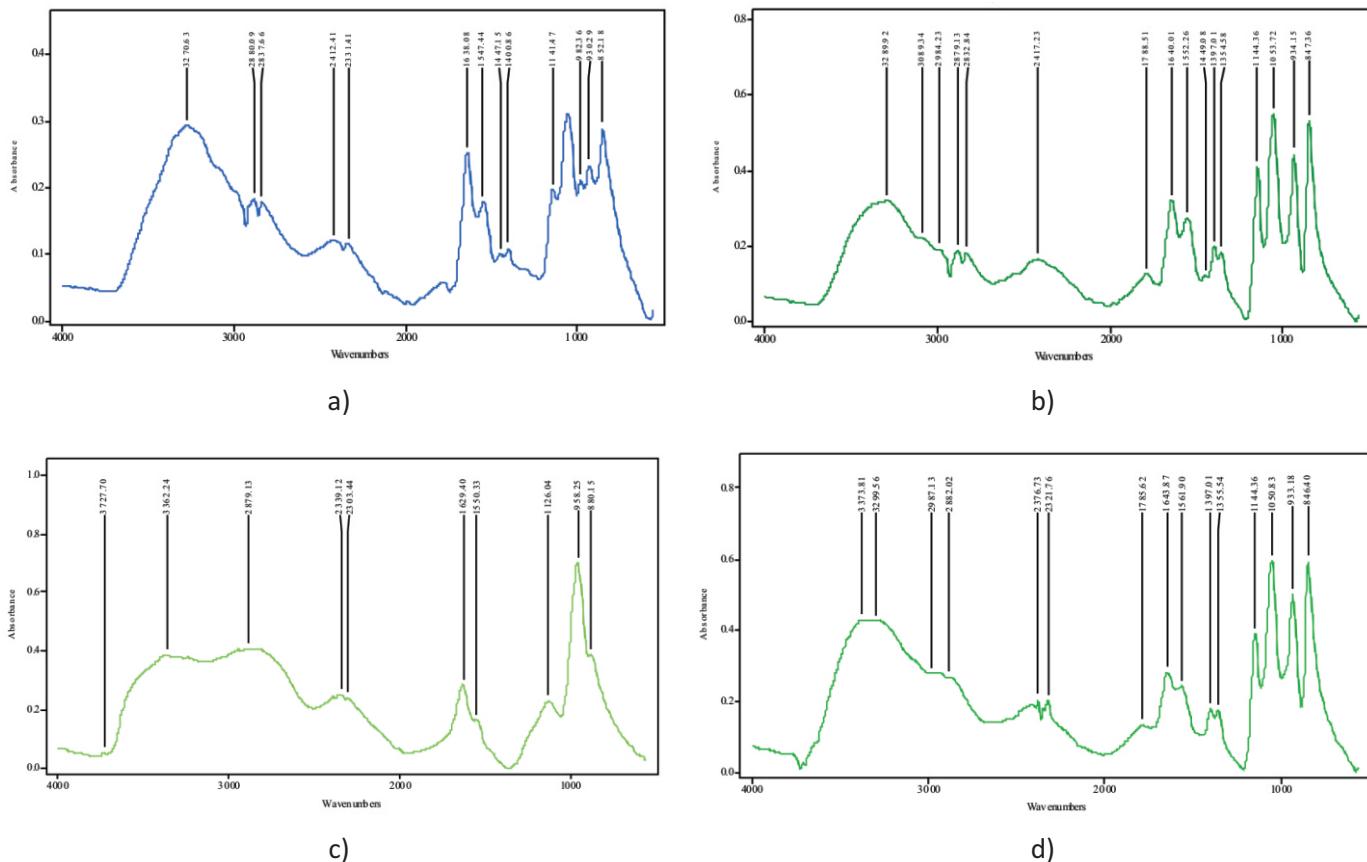


Figure 5. FT-IR spectra of cross-linked collagen matrices degraded with:
a) papain; b) trypsin; c) pepsin; d) collagenase

Figura 5. Spectrele FT-IR ale matricilor de colagen reticulata degradate cu:
a) papaină; b) tripsină; c) pepsină; d) colagenază

The modifications of collagen structure can be appreciated by the following semiquantitative relations [4]:

- A_{III}/A_{1450} ratio, correlated with maintaining of integrity of triple helical structure - values higher or equal to unity indicate preservation of conformation;

- A_i/A_A (Amide I / Amide A) ratio, correlated with the cross-linking degree: the higher the A_i/A_A ratio, the more advanced the cross-linking degree.

Comparing Figure 1 with Figures 4 and 5, the difference between reference samples (cross-linked and uncross-linked) and degraded samples with enzymes can be clearly seen.

Taking into account the ratio $A_{III}/A_{1450} \text{ cm}^{-1}$, no degraded sample kept its integrity. The samples degraded with papain kept the specific band from 1450 cm^{-1} which is specific for pyrrolidine ring, but they lost amide III, demonstrating the samples degradation. The A_i/A_A ratio was 0.834 for the uncross-linked sample and 0.862 for the cross-linked one.

The sample uncross-linked and degraded with trypsin showed that amide III and band corresponding to 1450 cm^{-1} are not present in the spectra, while the cross-linked one shows a peak at 1449 cm^{-1} . Also the A_i/A_A ratio is 1.0 for the cross-linked sample and 0.916 for the uncross-linked one, which indirectly demonstrated the cross-linking degree. The trypsin degraded the collagen less than papain.

Pepsin broke the collagen chains for both cross-linked and uncross-linked samples, the amide III and the band from 1450 cm^{-1} are not present in their spectra. The A_i/A_A ratio for samples degraded with pepsin is 0.743 (for uncross-linked collagen) and 0.841 (for cross-linked collagen).

The most degraded samples were the ones treated with collagenase which presented 0.604 and 0.651 A_i/A_A ratio for uncross-linked and cross-linked samples respectively.

The reference samples showed A_i/A_A ratio of 1.041 and 1.063 for uncross-linked and cross-linked samples.

Among the studied enzymes, collagenase produced total enzymatic hydrolysis of collagen, while

Modificările structurii colagenului pot fi apreciate prin utilizarea relațiilor semicuantitative [4]:

- Raportul A_{III}/A_{1450} , corelat cu menținerea integrității structurii de triplu helix – valori mai mari sau egale cu unitatea indică păstrarea conformației;
- Raportul A_i/A_A (Amida I/Amida A), corelat cu gradul de reticulare: un raport mare A_i/A_A indică un grad avansat al reticulării.

Prin compararea Figurii 1 cu Figurile 4 și 5 se poate observa foarte bine diferența dintre probele de referință (reticulate și nereticulate) din probele degradate cu enzime.

Tinând seama de raportul $A_{III}/A_{1450} \text{ cm}^{-1}$, nicio probă degradată nu și-a putut păstra integritatea. Probele degradate cu papaină au păstrat banda de la 1450 cm^{-1} , care este specifică pentru inelul pirolidinic, dar au pierdut amida III, demonstrând degradarea probelor. Raportul A_i/A_A a fost 0,834 pentru probele nereticulate și 0,862 pentru cele reticulate.

Probele nereticulate și degradate cu tripsină arată că amida III și banda de la 1450 cm^{-1} nu sunt prezente în spectru, în timp ce probele reticulate prezintă o bandă la 1449 cm^{-1} . De asemenea, raportul A_i/A_A este 1,0 pentru proba reticulată și 0,916 pentru cea nereticulată, ceea ce demonstrează indirect gradul de reticulare. Tripsina a degradat colagenul într-o măsură mai mică decât papaina.

Pepsina a rupt lanțurile de colagen atât pentru proba reticulată, cât și pentru cea nereticulată, amida III și banda de la 1450 cm^{-1} nefiind prezente în spectrul lor. Raportul A_i/A_A pentru probele degradate cu pepsină este 0,743 (pentru colagenul nereticulat) și 0,841 (pentru colagenul reticulat).

Probele cele mai degradate au fost cele tratate cu colagenază care au prezentat un raport A_i/A_A , de 0,604 și respectiv 0,651 pentru probele nereticulate și reticulate.

Probele de referință au prezentat un raport A_i/A_A , 1,041 și 1,063 pentru probele nereticulate și respectiv reticulate.

În urma studiilor de degradare enzimatică, colagenaza transformă în totalitate colagenul hidrolizat

pepsin, papain and trypsin hydrolyzed collagen towards polypeptides. Hydrolysis took place at peptidic bonds, as FT-IR results showed, because the amide III band corresponding to 1450 cm^{-1} disappeared during enzymatic degradation process.

CONCLUSIONS

The FT-IR spectra were performed before and after enzymatic biodegradation with collagenase, pepsin, trypsin and papain for uncross-linked and cross-linked collagen matrices. After degradation, the same type of samples were characterized through kinetic analysis. The most stable sponge against enzymatic biodegradation was proved to be the cross-linked one. The enzymes used have decreasing activity over the designed systems as follows: collagenase, pepsin, papain and trypsin.

Acknowledgements

The work was financially supported by the project POSDRU/89/1.5/S/52432 of 1.04.2010 - Institutional Organization of a Post-doctoral School of National Interest "Applied Biotechnology with Impact in the Romanian Economy"; the project was cofunded by the EU Social Fund in the framework of the Sectorial Operational Programme 2007-2013 for Human Resources Development.

enzimatic, în timp ce pepsina, papaina și tripsina hidrolizează colagenul până la polipeptide, procesul de degradare enzimatică având ca efect dispariția benzii de la 1450 cm^{-1} , după cum se poate vedea în rezultatele obținute prin spectroscopie FT-IR.

CONCLUZII

Spectrul FT-IR a fost efectuat înainte și după biodegradarea enzimatică prin folosirea colagenazei, pepsinei, tripsinei și papainei pentru matricile de colagen nereticulate și reticulate. Aceleași tipuri de probe, după degradare, au fost caracterizate prin analiza cinetică. Stabilitatea cea mai bună împotriva biodegradării enzimatice a fost cea a matricei reticulate. Enzimele folosite au avut o activitate atenuată asupra sistemelor, după cum urmează: colagenaza, pepsina, papaina și tripsina.

Mulțumiri

Lucrarea a fost susținută finanțat din proiectul POSDRU/89/1.5/S/52432 din 1.04.2010 - Organizarea instituțională a școlii post-doctorale de interes național "Biotehnologii aplicate cu impact în economia românească", proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013.

REFERENCES

1. Sionkowska, A., *Progress Polym. Sci.*, **2011**, 36, 1254–1276.
2. Albu, M.G., Titorencu, I., Ghica, M.V., Collagen-based Drug Delivery Systems for Tissue Engineering in R. Pignatello (Ed.), *Biomaterial/Book 3*, Rijeka, InTech, **2011**.
3. Badylac, S.F., Modification of Natural Polymers: Collagen in Atala, A., Lanza, R.P. (Eds.), *Methods of Tissue Engineering*, San Diego, CA: Academic Press, **2002**.
4. Albu, M.G., Collagen Gels and Matrices for Biomedical Applications, Saarbrucken, Lambert Academic Publishing, **2011**.
5. Okada, T., Hayashi, T., Ikada, Y., *Biomaterials*, **1992**, 13, 448-454.
6. Lazarus, G.S., Daniels, J.R., Lian, J., Burleigh, M.C., *Amer. J. Pathol.*, **1972**, 68, 565-578.
7. Yahyouche, A., Zhidao, X., Czernuszka, J.T., Clover, A.J.P., *Acta Biomater.*, **2011**, 7, 278-286.
8. Albu, M.G., Ghica, M.V., Ficai, A., Titorencu, I., Popa, L., *Proceed. 3rd Int. Conf. Adv. Mater. Syst.*, **2010**, 181-186.

9. Albu, M.G., Titorencu, I., Chelaru, C., *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2011**, 11, 1, 11-20.
10. Sripriya, R., Kumar, R., Balaji, S., Kumar, M.S., Sehgal, P.K., *React. Funct. Polym.*, **2011**, 71, 62–69.