## **BIOCOMPATIBILITY STUDY OF COLLAGEN NERVE CONDUCTORS**

## STUDIU DE BIOCOMPATIBILITATE A CONDUCTORILOR NERVOȘI DIN COLAGEN

### Madalina Georgiana ALBU<sup>1\*</sup>, Irina TITORENCU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INCDTP - Leather and Footwear Research Institute, Bucharest, Romania

<sup>2</sup>"Nicolae Simionescu" Institute of Biology and Cellular Pathology, Bucharest, Romania

#### **BIOCOMPATIBILITY STUDY OF COLLAGEN NERVE CONDUCTORS**

ABSTRACT. Peripheral nerve lesions are the cause of many lifelong disabilities, although peripheral nerves have self-regeneration capacity for less severe lesions. The paper presents nerve conductors developed based on collagen, with well-established properties and dimensions as required by peripheral nerve regeneration. These new materials have a native fibrillar structure of collagen; they are resistant to temperature, enzymatic degradation; they have a uniform microporous structure with pores of 5-20  $\mu$ m, internal diameter of 1.3 mm and are biocompatible with neural cells. The paper also presents the results of the biocompatibility study of collagen nerve conductors.

KEY WORDS: nerve conductors, neural cells, biocompatibility.

#### STUDIU DE BIOCOMPATIBILITATE A CONDUCTORILOR NERVOȘI DIN COLAGEN

REZUMAT. Leziunile nervilor periferici sunt cauza multor dizabilități de-a lungul vieții, deși nervii periferici prezintă capacitatea de auto-regenerare pentru leziunile mai puțin severe. În lucrare se prezintă conductori nervoși, care au fost dezvoltați pe bază de colagen, cu proprietăți și dimensiuni bine stabilite conform cerințelor regenerării nervilor periferici. Aceste materiale noi prezintă o structură fibrilară nativă a colagenului, sunt rezistente la temperatură, la degradare enzimatică, au o structură microporoasă uniformă cu pori de 5-20 µm, diametru intern de 1,3 mm și sunt biocompatibile cu celule neuronale. Lucrarea prezintă, de asemenea, rezultatele studiului de biocompatibilitate a conductorilor nervoși din colagen.

 ${\sf CUVINTE\,CHEIE:\, conductor i\, nervos i, celule\, neuronale, bio compatibilitate.}$ 

#### ÉTUDE DE BIOCOMPATIBILITÉ DES CONDUCTEURS NERVEUX DE COLLAGÈNE

RÉSUMÉ. Les lésions des nerfs périphériques sont la cause de nombreuses infirmités au long de la vie, bien que les nerfs périphériques ont la capacité d'autorégénération pour les blessures moins graves. Cet article présente des conducteurs nerveux développés à base de collagène, qui ont des propriétés et dimensions bien établies selon les exigences de la régénération des nerfs périphériques. Ces nouveaux matériaux ont une structure fibrillaire native de collagène, ils sont résistants à la température et à la dégradation enzymatique, ils ont une structure uniforme microporeuse avec des pores de 5-20 μm, un diamètre intérieur de 1,3 mm et sont biocompatibles avec les cellules neuronales. Cet article présente aussi les résultats de l'étude de biocompatibilité des conducteurs nerveux de collagène.

MOTS CLÉS: conducteurs nerveux, cellules neuronales, biocompatibilité.

# **INTRODUCTION**

Repairing nerve lesions is a serious health problem annually affecting 2.8% of patients [1]. In the annual database there are about 360,000 cases of peripheral nerve injuries in the U.S. and over 300,000 in Europe [2]. This type of injury is the cause of many lifelong disabilities, although peripheral nerves have self-regeneration capacity for less severe injuries. Therefore, there is a continuous international concern for a better recovery of nerve functions. Suturing terminal ends is an effective method for short-term nerve lesions while long-term nerve injuries require tubular structures [3].

## INTRODUCERE

Repararea leziunilor nervoase este o problemă gravă de sănătate care afectează anual 2,8% din pacienți [1]. În baza anuală de date există aproximativ 360,000 de cazuri de leziuni periferice nervoase în SUA, iar în Europa peste 300,000 [2]. Acest tip de leziuni sunt cauza multor dizabilități de-a lungul vieții, deși nervii periferici prezintă capacitatea de auto-regenerare pentru leziunile mai puțin severe. De aceea, pe plan internațional există o continuă preocupare pentru o recuperare mai bună a funcțiunilor nervoase. Suturarea la capetele terminale este o metodă eficientă pentru leziunile nervoase scurte, în timp ce leziunile nervoase lungi necesită structuri tubulare [3].

Correspondence to: Madalina Georgiana ALBU, INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu St., 031215, Bucharest, Romania, email:madalinaalbu@gmail.com.

Autologous nerve grafts are considered "gold standard" for long lesion repair, but for these, available tissues are limited, and the tissue sizes and structures are asymmetric [1-4].

Therefore nerve grafts have been developed, through bioengineering, from polymeric materials with well-established properties and dimensions as required by peripheral nerve regeneration. These materials are available in a wide range, from polymers of natural origin to non-degradable and biodegradable synthetic polymers.

There are many techniques for manufacturing polymers in order to obtain nerve conductors. Natural polymers used to produce nerve conductors include chitosan [5-11], collagen [12-24], gelatin [25-30], hyaluronic acid (HA) [31-34] and silk fibers [35, 36]. These polymers provide excellent biocompatibility, they are an ideal base for attachment and functionalization of cells, they decrease the frequency of immune response, they provide appropriate signals to cells without requiring growth factors and can be degraded by natural enzymes [37-39]. However, natural polymers have variations and require purification and characterization from batch to batch. Moreover, most of them do not have good mechanical strength and degrade relatively quickly in vivo [37-39]. Often natural polymers require chemical modification and cross-linking or combinations with other structural components such as synthetic polymers with good mechanical properties. Due to their low denaturation temperature and thermal stability, natural polymers are generally produced at room temperature by injection, immersion and electrospinning from polymer solutions.

An ideal biodegradable conductor should involve properties of maintaining its integrity and structure, to allow cell-cell communication and thus restore tissue during regeneration processes. For this to be achieved, the vital factors are mechanical properties, processing and material biocompatibility.

This paper presents the biocompatibility study with isolated neurons from neuroblastoma and glioma cell line of a nerve conductor from collagen obtained through a special technique [40]. Grefele nervoase autologe sunt considerate "gold standard" pentru repararea leziunilor lungi, dar pentru acestea ţesuturile disponibile sunt limitate, iar dimensiunile şi structurile tisulare sunt asimetrice [1–4].

Ca urmare, au fost dezvoltate, prin bioinginerie, grefe nervoase din materiale polimerice care au proprietăți și dimensiuni bine stabilite conform cerințelor regenerării nervilor periferici. Aceste materiale se găsesc într-o gamă largă, de la polimeri de origine naturală până la polimeri sintetici nedegradabili și biodegradabili.

Există numeroase tehnici de fabricare a polimerilor pentru obținerea conductorilor nervoși. Polimerii naturali utilizați pentru fabricarea conductorilor nervoşi includ chitosanul [5-11], colagenul [12-24], gelatina [25-30], acidul hialuronic (HA) [31-34] și fibrele de mătase [35, 36]. Acești polimeri oferă biocompatibilitate excelentă, reprezintă un suport ideal pentru ataşarea şi funcționalizarea celulelor, scad frecvența răspunsului imun, furnizează semnale corespunzătoare celulelor fără a necesita factori de creștere și pot fi degradate de enzime naturale [37-39]. Totuși, polimerii naturali prezintă variații și necesită purificare și caracterizare de la lot la lot. Mai mult, cele mai multe nu au rezistență mecanică bună și se degradează in vivo relativ repede [37-39]. Adesea polimerii naturali necesită modificări chimice și reticulări sau combinații cu alte componente structurale, cum ar fi polimerii sintetici cu proprietăți mecanice bune. Datorită temperaturii lor de denaturare scăzute și stabilității termice, polimerii naturali sunt în general fabricați la temperatura camerei prin injectare, imersare și electrofilare din soluții de polimeri.

Un conductor ideal biodegradabil ar trebui să implice proprietățile de menținere a integrității și structurii acesteia, pentru a permite comunicarea celulă-celulă și implicit refacerea țesutului în timpul proceselor de regenerare. Pentru ca aceasta să fie realizat, factorii vitali sunt proprietățile mecanice, procesarea și biocompatibilitatea materialului.

Această lucrare prezintă studiul de biocompatibilitate cu neuroni izolați din neuroblatom și celule gliale a unui conductor nervos din colagen obținut printr-o tehnică specială [40].

# MATERIALS AND METHODS

A collagen conductor obtained using a special technology [40] in the Collagen Department of INCDTP - Division ICPI constituted the subject of the biocompatibility study. FT-IR, DSC, SEM analyses, water absorption and enzymatic degradation were performed using the previously described methods of analysis [41-43].

### **Cell Culture**

For *in vitro* citocompatibility tests we used two different cell lines: HTB11 (neuroblastoma cell line derived from human bone marrow) and HTB14 glioma cell line. The cells were seeded onto collagen samples at 25×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> density, and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 1‰ glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/I penicillin, 100 U/I streptomycin and 50 U/I neomycin. The cell viability was assessed at 72 h after seeding.

### **Cell Viability**

Cell viability was determined by MTT (Sigma Germany) assay - a colorimetric method for the determination of cell densities. The assay is dependent on the cleavage of the yellow tetrazolium salt to the purple formazan crystals by metabolic active cells. Because tetrazolium salts are reduced to a colored formazan only by metabolically active cells, these assays detect viable cells exclusively. The cells on collagen samples were incubated with 0.5mg/mL of MTT for 4 h and then the medium was decanted, formazan salts were dissolved with 0.1N HCl in anhydrous isopropanol and the optical density of the formazan solution was read on a TECAN 24-well plate reader. As positive control we used cells grown only in culture medium. The results were expressed as viability percentage.

## MATERIALE ȘI METODE

Un conductor de colagen obținut după o tehnologie specială [40] în Departamentul Colagen al INCDTP - Sucursala ICPI a fost materialul studiului de biocompatibilitate. Analizele FT-IR, DSC, SEM, absorbție de apă și degradare enzimatică au fost efectuate după metodele de analiză descrise anterior [41-43].

#### **Cultura celulelor**

Pentru testele de citocompatibilitate *in vitro* s-au utilizat două tipuri diferite de celule: HTB11 (celule neuroblatom derivate din măduvă osoasă umană) și celule gliale HTB14. Celulele au fost așezate pe probele de colagen la o densitate de 25×10<sup>3</sup> celule/cm<sup>2</sup>, și cultivate în Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) cu 1‰ glucoză suplimentată cu 10% ser fetal de bovine (FBS), 100 U/I penicilină, 100 U/I streptomicină și 50 U/I neomicină. Viabilitatea celulelor s-a evaluat la 72 h după însămânțare.

### Viabilitatea celulelor

Viabilitatea celulelor a fost determinată prin analiză MTT (Sigma, Germania) - o metodă colorimetrică pentru determinarea densităților celulelor. Analiza depinde de clivajul sării galbene de tetrazolium la cristalele violet de formazan prin celulele active metabolic. Datorită faptului că sărurile de tetrazolium se reduc la formazan colorat doar prin intermediul celulelor active metabolic, aceste analize detectează doar celulele viabile. Celulele de pe probele de colagen au fost incubate cu 0,5mg/mL de MTT timp de 4 h și apoi s-a decantat mediul, sărurile de formazan s-au dizolvat cu 0,1N HCl în izopropanol anhidru și s-a citit densitatea optică a soluției de formazan cu o placă Petri de 24 de godeuri TECAN. Ca martor pozitiv s-au utilizat celule crescute doar în mediu de cultură. Rezultatele au fost exprimate în procentaj de viabilitate.

# **RESULTS AND DISCUSSIONS**

Generally, an ideal nerve conductor must be noncytotoxic, permeable, flexible enough, with an adequate degradation rate in order to enable axon regeneration and have minimal inflammatory responses [4].

The collagen nerve conductor used (Figure 1) was characterized through FT-IR spectrophotometric analyses, DSC thermal analyses, morphologic analyses such as water absorption and SEM, and enzymatic degradation.

## **REZULTATE ȘI DISCUȚII**

În general, un conductor nervos ideal trebuie să fie ne-citotoxic, permeabil, suficient de flexibil, cu o viteză de degradare corespunzătoare ca să poată furniza regenerarea axonilor și să prezinte răspunsuri inflamatorii minime [4].

Conductorul nervos din colagen (Figura 1) utilizat a fost caracterizat prin analize spectrofotometrice FT-IR, analize termice DSC, analize morfologice ca absorbția de apă și SEM, și degradare enzimatică.



Figure 1. Collagen nerve conductor Figura 1. Conductor nervos din colagen

FT-IR analyses show that the triple helix structure of the collagen was left intact, and the collagen used preserved its characteristic bands at 3340 cm<sup>-1</sup> for amide A, 2929 cm<sup>-1</sup> for amide B, 1650 cm<sup>-1</sup> for amide I, 1550 cm<sup>-1</sup> for amide II and 1240 cm<sup>-1</sup> for amide I, as it can be seen in Figure 2. Analizele FT-IR arată că structura triplu helicoidală a colagenului a rămas intactă, colagenul utilizat păstrându-și benzile caracteristice la 3340 cm<sup>-1</sup> pentru amida A, 2929 cm<sup>-1</sup> pentru amida B, 1650 cm<sup>-1</sup> pentru amida I, 1550 cm<sup>-1</sup> pentru amida II și 1240 cm<sup>-1</sup> pentru amida I, așa cum se poate vedea din Figura 2.



Figure 2. FT-IR spectrum of nerve conductor Figura 2. Spectru FT-IR al conductorului nervos

Thermal analyses, as well as enzymatic degradation also show good stability of the nerve conductor. The latter presents a denaturation temperature of 94.8°C in nitrogen atmosphere and degrades *in vitro* in a collagenase solution by 54% after 3 weeks.

SEM images in Figure 3, in section (a) and on the surface (b), exhibit homogenous porous structures, with interconnected pores of sizes ranging between 5-20  $\mu$ m, and the inner diameter is approximately 1.3 mm.



Analizele termice, cât și degradarea enzimatică, arată de asemenea o bună stabilitate a conductorului nervos. Acesta prezintă o temperatură de denaturare la 94,8°C în atmosferă de azot și se degradează *in vitro* într-o soluție de colagenază în proporție 54% după 3 săptămâni.

Imaginile SEM din Figura 3, în secțiune (a) și pe suprafață (b), prezintă structuri poroase omogene, cu pori interconectați de dimensiuni cuprinse între 5-20  $\mu$ m, iar diametrul interior este de aproximativ 1,3 mm.



Figure 3. SEM images of collagen conductor, a) section; b) surface Figura 3. Imagini SEM ale conductorului de colagen, a) secțiune; b) suprafață

Due to the obtaining technology, the nerve conductor absorbs up to 80% water, a low amount compared to spongious forms which absorb up to 300-400% water.

The collagen conductor with the established characteristics was tested in terms of biocompatibility with HTB11 and HTB14 cells. Viability results are presented comparatively in Figure 4, and fluorescence microscopy images in Figure 5.

Datorită tehnologiei de obținere, conductorul nervos absoarbe o cantitate de până la 80% apă, cantitate mică comparativ cu bureții spongioși care absorb până la 300-400% apă.

Conductorul colagenic cu caracteristicile stabilite a fost testat din punct de vedere al biocompatibilității cu celulele HTB11 și HTB14. Rezultatele de viabilitate sunt prezentate comparativ în Figura 4, iar imaginile de microscopie de fluorescență în Figura 5.







Figure 5. Cell cultures a) HTB14 and b) HTB11 one week from seeding on the nerve conductor; left – phase contrast, right – Hoechst colouring
Figura 5. Culturi de celule a) HTB14 şi b) HTB11 la o săptămână de la însămânţare pe conductorul nervos; stânga – contrast de fază, dreapta – colorare cu Hoechst

As it can be noticed in Figures 4 and 5, the nerve conductor supported the adhesion and growth of neural cells, A higher degree of colonization was recorded in the case of astrocytes (HTB14), results confirmed by MTT analyses (Figure 4). Aşa cum se poate vedea din Figurile 4 şi 5, conductorul nervos a susţinut adeziunea şi creşterea celulelor neuronale. Un grad mai înalt de colonizare a fost înregistrat în cazul astrocitelor (HTB14), rezultate confirmate de analizele MTT (Figura 4).

# CONCLUSIONS

Nerve conductors based on collagen were developed, with well-established properties and sizes. These materials present a native collagen fibrillar structure, they are resistant to temperature, to enzymatic degradation, they have a uniform microporous structure with pores of 5-20  $\mu$ m and diameter of 1.3 mm, they are biocompatible with neural cells. Due to physical-chemical, morphologic and biocompatibility characteristics, the collagen nerve conductor proved to be a promising biomaterial for nerve regeneration.

### Acknowledgements

This paper was financed by CNCSIS-UEFISCDI, PNII – IDEI project, financing contract no. 1177/2009, CNCSIS Code 1429.

# CONCLUZII

Au fost dezvoltați conductori nervoși, pe bază de colagen, cu proprietăți și dimensiuni bine stabilite. Aceste materiale prezintă o structură fibrilară nativă a colagenului, sunt rezistente la temperatură, la degradare enzimatică, au o structură microporoasă uniformă cu pori de 5-20 µm și diametru de 1,3 mm, sunt biocompatibile cu celulele neuronale. Datorită caracteristicilor fizico-chimice, morfologice și de biocompatibilitate, conductorul nervos de colagen s-a dovedit un biomaterial promițător pentru regenerarea nervoasă.

### Mulţumiri

Această lucrare a fost finanţată de CNCSIS-UEFISCDI, proiect PNII – IDEI, contract de finanţare nr. 1177/2009, Cod CNCSIS 1429.

# REFERENCES

- 1. Belkas, J.S., Shoichet, M.S., Midha, R., Neurol. Res., 2004, 26, 2, 151–160.
- 2. Noble, J., Munro, C.A., Prasad, V.S.S.V., Midha, R., J. Trauma, **1998**, 45, 1, 116–122.
- 3. Bellamkonda, R.V., Biomaterials, 2006, 27, 19, 3515–3518.
- 4. de Ruiter, G.C.W., Malessy, M.J.A., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., Spinner, R.J., Neurosurg. Focus, 2009, 26, 2, 1–9.
- 5. Wang, W., Itoh, S., Matsuda, A. et al., J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2008, 85, 4, 919–928.
- 6. Wang, X., Hu, W., Cao, Y., Yao, J., Wu, J., Gu, X., Brain, 2005, 128, 8, 1897–1910.
- 7. Wang, D.-Y., Huang, Y.-Y., J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2008, 85, 2, 434–438.
- 8. Wang, A., Ao, Q., Wei, Y. et al., *Biotechnol. Lett.*, **2007**, 29, 11, 1697–1702.
- 9. Freier, T., Montenegro, R., Koh, H.S., Shoichet, M.S., Biomaterials, 2005, 26, 4624–4632.
- 10. Xie, F., Qing, F.L., Gu, B., Liu, K., Guo, X.S., Microsurg., 2008, 28, 6, 471–479.
- 11. Pfister, L.A., Papalo "izos, M., Merkle, H.P., Gander, B., J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2007, 80, 4, 932–937.
- 12. Alluin, O., Wittmann, C., Marqueste, T. et al., *Biomaterials*, 2009, 30, 3, 363–373.
- 13. Li, S.-T., Archibald, S.J., Krarup, C., Madison, R.D., Clin. Mater., 1992, 9, 3-4, 195–200.
- 14. Chamberlain, L.J., Yannas, I.V., Hsu, H.-P., Spector, M., J. Comp. Neurol., 2000, 417, 4, 415–430.
- 15. Harley, B.A., Spilker, M.H., Wu, J.W. et al., *Cells Tissues Organs*, **2004**, 176, 1-3, 153–165.
- 16. Yao, L., de Ruiter, G.C.W., Wang, H. et al., *Biomaterials*, **2010**, 31, 22, 5789–5797.
- 17. Okamoto, H., Hata, K.-I., Kagami, H. et al., J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2010, 92, 3, 859–868.
- 18. Bozkurt, A., Deumens, R., Beckmann, C. et al., *Biomaterials*, 2009, 30, 2, 169–179.
- 19. Bozkurt, A., Brook, G.A., Moellers, S. et al., *Tissue Eng.*, **2007**, 13, 12, 2971–2979.
- Kroehne, V., Heschel, I., Sch
   "ugner, F., Lasrich, D., Bartsch, J.W., Jockusch, H., J. Cell. Mol. Med., 2008, 12, 5A, 1640–1648.
- 21. Ahmed, M.R., Vairamuthu, S., Shafiuzama, M.D., Basha, S.H., Jayakumar, R., Brain Res., 2005, 1046, 1-2, 55–67.
- 22. Ahmed, M.R., Venkateshwarlu, U., Jayakumar, R., *Biomaterials*, **2004**, 25, 13, 2585–2594.

- 23. Hu, X., Huang, J., Ye, Z. et al., *Tissue Eng. Part A*, **2009**, 15, 11, 3297–3308.
- 24. Wang, X., Zhang, J., Chen, H., Wang, Q., J. Appl. Polym. Sci., 2009, 112, 6, 3652–3662.
- 25. G´amez, E., Goto, Y., Nagata, K., Iwaki, T., Sasaki, T., Matsuda, T., Cell Transplant., 2004, 13, 5, 549–564.
- 26. Chang, J.-Y., Ho, T.-Y., Lee, H.-C. et al., Artif. Organs, 2009, 33, 12, 1075–1085.
- 27. Liu, B.-S., J. Biomed. Mater. Res. Part A, **2008**, 87, 4, 1092–1102.
- 28. Lu, M.-C., Hsiang, S.-W., Lai, T.-Y., Yao, C.-H., Lin, L.-Y., Chen, Y.-S., J. Biomater. Sci., Polym. Ed., 2007, 18, 7, 843–863.
- 29. Chen, Y.-S., Chang, J.-Y., Cheng, C.-Y., Tsai, F.-J., Yao, C.-H., Liu, B.-S., Biomaterials, 2005, 26, 18, 3911–3918.
- 30. Chang, J.-Y., Lin, J.-H., Yao, C.-H., Chen, J.-H., Lai, T.-Y., Chen, Y.-S., *Macromol. Biosci.*, **2007**, 7, 4, 500–507.
- 31. Miyamoto, K., Sasaki, M., Minamisawa, Y., Kurahashi, Y., Kano, H., Ishikawa, S.-I., J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2004, 70, 4, 550–559.
- 32. Sakai, Y., Matsuyama, Y., Takahashi, K. et al., *Biomed. Mater. Eng.*, 2007, 17, 3, 191–197.
- 33. Leach, J.B., Schmidt, C.E., Biomaterials, 2005, 26, 2, 125–135.
- 34. Jansen, K., van der Werff, J.F.A., van Wachem, P.B., Nicolai, J.-P.A., de Leij, L.F.M.H., Van Luyn, M.J.A., *Biomaterials*, **2004**, 25, 3, 483–489.
- 35. Yang, Y., Ding, F., Wu, J. et al., *Biomaterials*, 2007, 28, 36, 5526–5535.
- 36. Madduri, S., Papaloizos, M., Gander, B., Biomaterials, 2010, 31, 8, 2323–2334.
- 37. Chiono, V., Tonda-Turo, C., Ciardelli, G., Int. Rev. Neurobiol., 2009, 87, 173–198.
- 38. Ciardelli, G., Chiono, V., *Macromol. Biosci.*, **2006**, 6, 1, 13–26.
- 39. Schmidt, C.E., Leach, J.B., Annu. Rev. Biomed. Eng., 2003, 5, 293–347.
- 40. Patent Application no. A / 01336 from 7.12.2011.
- 41. Albu, M.G., Ficai, A., Lungu, A., *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2010**, 10, 3, 39-50.
- 42. Albu, M.G., Titorencu, I., Chelaru, C., *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2011**, 11, 1, 11-20.
- 43. Albu, M.G., Ferdeş, M., Giurginca, M., Chelaru, C., Constantinescu, R., Ghica, M.V., *Revista de Pielarie Incaltaminte* (*Leather and Footwear Journal*), **2011**, 11, 3, 191-200.