



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Polilaktidų karkasų žmogaus audinių inžinerijai gamyba ir tyrimas

Baigiamasis magistro projektas

Laura Kanapeckaitė

Projekto autorė

v.m.d. dr. Edvinas Krugly

Vadovas

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Polilaktidų karkasų žmogaus audinių inžinerijai gamyba ir tyrimas

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Laura Kanapeckaitė

Projekto autorė

v.m.d. dr. Edvinas Krugly

Vadovas

Prof. dr. Ramunė Rutkaitė

Recenzentė

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas

Farmacijos fakultetas

Laura Kanapeckaitė

Polilaktidų karkasų žmogaus audinių inžinerijai gamyba ir tyrimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – KTU) ir Lietuvos sveikatos universiteto (toliau – LSMU) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei KTU ir LSMU akademinės etikos kodeksuose nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal KTU ar LSMU galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta iš KTU ar LSMU, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Laura Kanapeckaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Kanapeckaitė, Laura. Polilaktidų karkasų žmogaus audinių inžinerijai gamyba ir tyrimas. Baigiamasis magistro projektas / vadovas v.m.d. dr. Edvinas Krugly; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: elektroverpimas, audinių inžinerija, regeneracinė medicina, karkasas, polipieno rūgštis.

Kaunas, 2022. 73 p.

Santrauka

Audinių ir organų nepakankamumas yra rimta sveikatos priežiūros problema visame pasaulyje. Šiai problemai spręsti kuriamos išmanios technologijos orientuotos į savaiminę audinio regeneraciją. Lydalo elektroverpimas yra mažai ištirta, žalia technologija, sulaukianti vis daugiau susidomėjimo biomedicinoje, nes šiuo metodu iš polimero lydalo kuriamos įvairių formų struktūros, galinčios imituoti natūralią tarpląstelinės matricos aplinką. Sėkmingas karkaso pritaikymas audinių inžinerijoje priklauso nuo daugelio jo savybių: biologinio suderinamumo, biologinio skaidumo, architektūros, mechaninių savybių. Atsižvelgiant į norimą pritaikymą, karkasų savybes galima modifikuoti keičiant elektroverpimo parametrus proceso metu. Todėl norint pritaikyti lydalo elektroverpimo techniką regeneracinėje medicinoje reikia geriau suprasti karkasų gamybą, todėl būtina ištirti juos reguliuojančių parametų poveikį.

Magistro baigiamajam projektui įgyvendinti pasirinkta medžiaga atitinkanti audinių inžinerijai keliamus reikalavimus. Dėl puikaus biologinio suderinamumo, bioskaidumo bei apdorojamumo, kaip žaliava pasirinktas polilaktidas. Tyrimo metu įvertinta skirtingų lydalo elektroverpimo parametų: filamento kaitinimo temperatūra, tiekimo debitas, įtampa ir atstumas tarp adatos ir kolektoriaus, įtaka PLA pluošto savybėms. Lydalo elektroverpimu suformuoti PLA karkasai analizuoti atliekant cheminių, fizikinių bei mechaninių savybių tyrimus.

Tyrimo rezultatai atskleidė, kad visi elektroverpimo parametrai turėjo reikšmingą poveikį karkaso morfologijai. Suformuoti PLA konstruktai pasižymėjo pluoštine struktūra su atsitiktinai orientuotomis ir tarpusavyje susivijusiomis gijomis. Analizuojant skenuojančios elektroninės mikroskopijos vaizdus atstumo ir įtampos tarp adatos ir kolektoriaus verčių didinimas buvo akivaizdus. Nustatyta, kad konstrukto vidutinis gijų skersmuo, esant skirtingoms temperatūros ir filamento tiekimo debito vertėms svyravo nuo 59,29 μm iki 23,55 μm , nuo 35,92 μm iki 19,82 μm , nuo 39,99 μm iki 13,56 μm . Didžiausią įtaką pluošto gijų skermeniui turėjo PLA filamento kaitinimo temperatūra ir tiekimo debitas. Didėjant šių parametų vertėms pluošto gijų skersmuo mažėjo, o mažiausias gijų skersmuo (10,01 μm) gautas esant 230 $^{\circ}\text{C}$ temperatūrai ir 8,06 mg/min polimero tiekimo debitui. FTIR analizė atskleidė, kad lydalo elektroverpimu suformuoti PLA karkasai turėjo PLA būdingas funkcines grupes. Nustatyta, kad 230 $^{\circ}\text{C}$ temperatūra, turėjo neigiamą įtaką PLA konstrukto cheminei struktūrai. Atlikus vandens vilgymo kampo analizę, nustatyta, kad mažėjant įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus parametų vertėms PLA karkasų hidrofobiškumas mažėjo. Mažiausias hidrofobiškumas konstrukto vandens vilgymo kampas – 107,8 $^{\circ}$. Tempimo bandymu geriausiomis mechaninėmis savybėmis tempiant pasižymėjo PLA karkasai, suformuoti esant

mažiausiai temperatūrai ir tiekimo debitui. Stipris tempiant gautas 2,56 MPa, o tamprumo modulis – 123,6 N/mm².

Kanapeckaite, Laura. Production and Research of Polylactide Scaffolds for Human Tissue Engineering. Master's Final Degree Project /supervisor vyr. m. d. dr. Edvinas Krugly; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: electrospinning, tissue engineering, regenerative medicine, scaffold, polylactic acid.

Kaunas, 2022. 73 pages.

Summary

Tissue and organ failure is a serious health care problem worldwide. Smart technologies developed to tackle this problem are focused on spontaneous tissue regeneration. Melt Electrospinning is a poorly researched, green technology that attracts increasing interest in biomedicine, as it creates various forms of structures from polymer melt that can simulate the natural environment of the extracellular matrix. The successful application of the Scaffold in Tissue engineering depends on many of its characteristics: biocompatibility, biodegradability, architecture, mechanical properties. Depending on the desired adjustment, the Scaffold properties can be modified by changing the Electrospinning parameters during the process. Therefore, the application of the melt Electrospinning technique in Regenerative medicine requires a better understanding of the production of Scaffolds and therefore the impact of the parameters regulating them must be investigated.

The material selected for the implementation of the masters final project meets the requirements for Tissue engineering. Polylactide has been selected as a raw material for excellent biocompatibility, biodegradability and treatment. The study assessed the different Electrospinning parameters of the melt: filament heating temperature, supply debit, voltage and distance between needle and collector, influence on the properties of the PLA fiber. PLA Scaffolds formed by Melt Electrospinning have been analyzed in chemical, physical and mechanical tests.

The results of the study revealed that all parameters of Electrospinning had a significant effect on Scaffold morphology. The formed PLA Scaffolds had a fibrous structure with random and intertwined fiber. Increasing the distance and tension between the needle and the collector values was evident when analyzing the scanning electronic microscopy images. The average diameter of the fiber was found to vary from 59,29 μm to 23,55 μm at different temperature and filament delivery debit values, from 35,92 μm to 19,82 μm , from 39,99 μm to 13,56 μm . The heating temperature of the PLA fiber and the supply debit had the greatest impact on the diameter of fiber. As the values of these parameters increased, the diameter of fiber declined and the smallest diameter of fiber (10,01 μm) was obtained at 230 $^{\circ}\text{C}$ and 8,06 mg/min of polymer supply. The FTIR analysis revealed that PLA Scaffolds formed by Melt Electrospinning had functional groups specific to PLA. It was found that the temperature of 230 $^{\circ}\text{C}$ had a negative impact on the chemical structure of PLA structures. The water contact angle analysis showed that the hydro-phobic status of PLA Scaffolds decreased as the values of voltage and distance between needle and collector parameters decreased. The minimum hydrophobic angle of contacting of the construction water is 107,8 $^{\circ}$. The stretch test, with the best mechanical properties being stretched, was characterized by PLA Scaffolds formed at the lowest temperature and supply controversy. The tension strength is 2,56 MPa and the elasticity module is 123.6 N/mm²

Turinys

Santrumpų sąrašas	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Regeneracinės medicinos poreikis	10
1.2. Audinių regeneracijai skirti polimeriniai karkasai	12
1.2.1. Regeneracinei medicinai skirtų polimerinių karkasų funkcijos	12
1.2.2. Regeneracinei medicinai skirtų polimerinių karkasų savybės.....	13
1.2.3. Regeneracinėje medicinoje naudojamos medžiagos	15
1.3. Polimerinių trimačių konstrukčių gamybos būdai	23
1.3.1. Lydzios masės modeliavimas	23
1.3.2. Selektyvus kietinimas lazeriu	24
1.3.3. Stereolitografijos technologija.....	25
1.3.4. Biospausdinimo technologija	26
1.3.5. Elektroverpimo technologija	27
1.4. Suformuotų polimerinių matricių tyrimų apžvalga	29
1.5. Darbo aktualumo pagrindimas	37
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	38
2.1. Polilaktido filamentų formavimas	40
2.2. Žingsninio tiektuvo debito matavimas	40
2.3. Pirminis proceso optimizavimo eksperimentas	41
2.4. PLA konstrukčių formavimas lydalo elektroverpimo metodu	42
2.5. Skenuojančios mikroskopijos analizė.....	43
2.6. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos analizė.....	44
2.7. Vandens vilgymo kampo nustatymas PLA konstrukčių paviršiuje	45
2.8. PLA konstrukčių mechaninių savybių analizė	46
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	48
3.1. Pirminis proceso optimizavimo eksperimentas	48
3.2. Skenuojančios elektroninės mikroskopijos analizė	48
3.3. Lydalo elektroverpimo proceso parametrų įtaka karkasų morfologijai	50
3.4. Fizikocheminė PLA konstrukčių analizė	53
3.4.1. PLA konstrukčių cheminės savybės.....	53
3.4.2. Vandens vilgymo kampo nustatymas konstrukčių paviršiuje	56
3.4.3. Mechaninių savybių įvertinimas tempiant.....	59
Rekomendacijos	63
Išvados	64
Literatūros sąrašas	65

Santrumpų sąrašas

TE – audinių inžinerija;

RE – regeneracinė medicina;

ECM – tarpląstelinė matrica;

bFGF – pagrindinis fibroblastų augimo faktorius;

FDA – maisto ir vaistų administracija;

ISO – Tarptautinė standartų organizacija;

PLA – polipieno rūgštis;

LA – pieno rūgštis;

PCL – polikaprolaktonas;

PGA – poliglikolio rūgštis;

FDM – lydžios masės modeliavimas;

SLS – selektyvus kietinimas lazeriu;

SLA – stereolitografija;

MES – lydalo elektroverpimas;

SEM – skenuojanti elektronų mikroskopija;

FTIR – Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija.

Įvadas

Ilgėjant gyvenimo trukmei ir vykstant demografiniam senėjimui kasmet atsiranda vis daugiau žmonių, kenčiančių nuo organų disfunkcijos ar organų nepakankamumo dėl pažeistų ar ligotų audinių. Žmogaus kūno gebėjimas atkurti audinių praradimą yra ribotas, o dažnai natūraliai sugiję sužalojimai ir defektai po traumos sukelia funkcinius sutrikimus, dėl ko suprastėja gyvenimo kokybė. Šiuo metu norint atkurti sunaikintus audinius esant patologijai, įgimties defektams ar trauminiais sužalojimams atliekama audinių transplantacija. Tačiau, ne visuomet įprastiniai audinių pakaitalai (autotransplantatai ir alotransplantatai) užtikrina audinio funkcijos maksimalų atstatymą. Dažnas šios procedūros iššūkis transplantato atmetimas – imuninis atsakas į donoro svetimus antigenus [1]. Nepaisant to, dažnai audiniai ir organai transplantacijai reikalingi nedelsiant. Europos tarybos [2] 2020 metų duomenimis, Europoje kas valandą 6 žmonės įtraukiami į transplantacijos laukiančiųjų sąrašą ir kiekvieną dieną nesulaukęs transplantacijos vidutiniškai miršta 21 pacientas. Tačiau reikia paminėti, kad dėl didėjančio transplantacijos laukiančiųjų skaičiaus ir biologinio suderinamumo problemų, kurios lemia organų donorų trūkumą, reikia ieškoti kitų efektyvesnių metodų pažeistiems organams ir audinių funkcijoms atkurti.

Šiuo metu sparčiai tobulėjanti medicinos šaka, apjungianti audinių inžinerijos ir atsinaujinimo principus yra regeneracinė medicina. Jos tikslas yra pakeisti ar atstatyti pažeistus audinius ir organus. Šiems rezultatams pasiekti naudojamos priemonės gali apimti biologiškai aktyvių molekulių naudojimą, siekiant paskatinti audinių regeneraciją tiesiogiai pažeidimo vietoje, ląstelių terapiją bei audinių inžineriją [3].

Audinių inžinerija yra sritis, kuri remiasi medicinos, biologijos, inžinerijos ir medžiagų mokslo sričių principais ir integruoja juos į biologinių pakaitalų kūrimą, siekiant atkurti, palaikyti ar pagerinti audinių funkcijas [4]. Visa tai siekiama įgyvendinti naudojant tiek biomedžiagas, tiek įvairius procesus, kurie apima stereolitografiją, selektyvų kietinimą lazeriu, trimatį spausdinimą ar modeliavimą nusodinimu. Pastaraisiais metais vis populiariesnis tampa polimerų nanopluoštų formavimas taikant lydalo elektroverpimo technologiją. Elektroverpimas suteikia galimybę naudoti platų polimerų asortimentą, tokiu būdu leisdamas kontroliuoti konstrukto savybes. Norint sukurti efektyvų konstrukta, svarbu parinkti tinkamą medžiagą, kuri užtikrintų kokybišką ląstelių adheziją, migraciją ir proliferaciją [4]. Šiuo metu polipieno rūgštis, gaunama iš atsinaujinančių išteklių, tokių kaip kukurūzai, sulaukia nemažai dėmesio kaip biologiškai skaidus ir suderinamas polimeras medicinos srityje [5].

Tyrimo tikslas – suformuoti ir ištirti žmogaus audinių inžinerijai skirtus karkasus polimero lydalo elektroverpimo metodu.

Tikslui pasiekti suformuluoti uždaviniai:

1. parinkti tinkamą polimerą remiantis mokslo literatūra;
2. suformuoti žmogaus audinių inžinerijai skirtus karkasus polimero lydalo elektroverpimo metodu;
3. ištirti suformuoto karkaso chemines, fizikines ir mechanines savybes;
4. nustatyti priklausomybes tarp proceso parametrų bei karkaso savybių.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Regeneracinės medicinos poreikis

Audinių ir organų nepakankamumas dėl ligų, traumų ir vystymosi defektų yra viena pagrindinių ekonomikos ir sveikatos priežiūros problemų. Šiuo metu, klinikinėje praktikoje situacijai spręsti taikoma paaukotų nepažeistų organų ir audinių transplantacijos terapija, tačiau, transplantacija turi keletą apribojimų, įskaitant ribotą audinių prieinamumą, nesuderinamumą ir infekcijos riziką [6]. Ne gana to, tarptautiniu mastu šis poreikis nuolat auga. Be to, dėl didelių logistinių suvaržymų dalis donorų audinių, organų negali būti pristatyti ir sėkmingai persodinti pacientui per labai ribotą laiką. Siekiant išvengti imuninio transplantato atmetimo kartu su transplantacija būtina imunosupresinė terapija. Ši terapija nėra tinkama visiems pacientams, o svarbiausia gali sukelti šalutinį poveikį.

Širdies ir kraujagyslių ligos yra pagrindinės mirties priežastys visame pasaulyje [7]. 2019 metų Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis kasmet apie 17,9 milijonų žmonių miršta dėl širdies ir kraujagyslių ligų [8]. Šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojami autologiniai kraujagyslių transplantatai turi trombozės riziką. Įvairūs kaulų lūžiai, osteoartritas, osteoporozė ar kaulų vėžys yra dažnos ir reikšmingos klinikinės problemos. Farmacijos kompanijos „Pfizer“ 2019 m. duomenimis [9] vakarų Europoje osteoartritu serga daugiau nei 57 milijonai žmonių, o bendrai nuo 1990 m. sergančiųjų skaičius išaugo 54 %. Šiuo metu prieinami kaulų pakaitalai, įskaitant autotransplantatus, alotransplantatus ir sintetines medžiagas, pagal dažnumą užima antrą vietą tarp implantuojamų medžiagų pasaulyje [7]. Kremzlė yra jungiamasis audinys, kurį sudaro nedidelis procentas chondrocitų ir tarpląstelinė matrica, susidedanti iš kolagenų ir proteoglikanų tinklo [10]. Dėl mažo chondrocitų ląstelių skaičiaus ir vaskuliarizacijos nebuvimo audinio regeneracinis potencialas yra mažas – todėl audinį sunku atkurti be chirurginės intervencijos. Dažniausiai negydomi kremzlinio audinio sužalojimai galiausiai progresuoja osteoartrito link, o šiuo metu efektyviausias ligos gydymas yra endoprotezavimo operacija, kai pažeisti komponentai pašalinami ir pakeičiami dirbtiniais. Ligos ar traumos pablogina žmonių gyvenimo kokybę, padidina sveikatos priežiūros išlaidas ir sukelia audinių pažeidimus, kuriems dabartinė medicina nepajėgi. Šiuo metu pažeistų audinių gydymui naudojami metodai nėra tobuli. Tradiciniai implantai vidutiniškai tarnauja apie 10 – 15 metų, todėl juos reikia atnaujinti, o pakartotinos operacijos apsunkina pacientų būklę. Be to, pasitaiko implantų gedimų, dėl atsipalaidavimo, uždegimo, infekcijos ar susidėvėjimo [11].

Siekiant išspręsti šias problemas, audinių inžinerija kartu su regeneracine medicina nuo 1990 metų pradžios tapo populiari mokslinių tyrimų sritis [12]. Audinių inžinerija (TE, angl. *Tissue engineering*) ir regeneracinė medicina (RM, angl. *Regenerative medicine*) yra daugiadisciplinės sritys, kuriose sujungiamos žinios ir technologijos iš skirtingų sričių: biologijos, chemijos, inžinerijos, medicinos, farmacijos ir medžiagų mokslo, siekiant sukurti produktus, skirtus pažeistiems audiniams ir organams atkurti [6]. Pagrindiniai TERM elementai apima ląsteles, biologinius veiksnius ir 3D struktūras. Ląstelės yra audinių statybinė medžiaga, kuri atlieka svarbų vaidmenį audinių gijimui ir regeneracijai. Konstruktai yra porėtos struktūros, pagamintos iš biologiškai suderinamų medžiagų, skatinantys ląstelių adheziją, migraciją ir proliferaciją. Pažangiomis technologijomis kuriamos įvairių formų struktūros, imituojančios natūralią tarpląstelinės matricos (ECM, angl. *extracellular matrix*) aplinką ir galinčios vienodai paskirstyti ląsteles, kad būtų skatinama endogeninė regeneracija [13]. Konstrukto gijimo procesas vyksta trimis sudėtingais etapais: uždegiminis procesas, ląstelių proliferacija ir tarpląstelinės matricos remodeliavimas [14]. Pirmiausia, uždegiminis procesas inicijuoja audinio gijimą. Audinių gijimas yra procesas, kurio metu audiniai struktūriškai arba

funkciniu požiūriu atkuriami po sužalojimo. Audiniai gali gyti dviem būdais: restitucija arba substitucija. Esant mažesniems pažeidimams atkurama normali audinio struktūra restitucijos būdu. Esant rimtam pažeidimui, audinio atkūrimas negalimas. Tokiu atveju audiniai gyja substitucijos būdu – defektai iš kraštų užsipildo įaugančiu jaunu jungiamuoju audiniu, randu ir audinio sritis praranda savo funkciją. Pažeisto audinio vietoje konstruktas yra kaip atrama, kuri palengvina ląstelių augimą ir audinio struktūros formavimąsi. Karkasui yrant, jo vieta pakeičiama nauju funkciniu audiniu [3].

Kitaip nei titano ar kitų metalų implantai, suyrantys konstruktai, implantuoti į žmogaus kūną, neardo audinių. Konstruktai suyra ir neblokuoja kompiuterinės tomografijos, todėl palengvina medicininius vaizdinius vertinimus. Be to, šiems konstruktams nereikia pakartotinių operacijų, todėl medicininės išlaidos mažesnės, o pacientų pažeista sritis karkasui irstant atsinaujina. Svarbiausia – tokie karkasai gali būti suformuoti taip, kad atitiktų individualaus paciento anatomiją, o jų sudėtis ir struktūra gali būti pritaikyti specifiniams poreikiams [15].

Su šia nauja sritimi siejama daug lūkesčių, susijusių su geresnėmis gydymo galimybėmis, geresne paciento gyvenimo kokybe ir gebėjimu ateityje įveikti didelių transplantacijos procedūrų poreikį. Regeneracinės medicinos technologija gali būti naudinga atkurti dėl amžiaus, ligų ar traumų pažeistus audinius ir organus bei įgimus defektus. Moksliniai tyrimai apima įvairių audinių ir organų atstatymą: kaulų, kremzlės ir raumens defektus, kraujagyslių ligas, nervų sistemos sutrikimus, kaukolės ir veido rekonstrukcijas, odos žaizdas ir nudegimus, virškinamojo trakto ir urogenitalinius audinius [16]. Šiuo metu yra nemažai tyrimų, įrodančių, kad į suformuotus karkasus lengvai įsiskverbia ląstelės, vėliau gaminančios ECM. Mokslininkai Farrugia ir kt. [17] tai įrodė su 200 mm storio polikaprolaktono konstruktais, pagamintais lydalo elektroverpimu. Ant konstrukto buvo pasėti odos fibroblastai ir kultivuojami 14 dienų. Nastatyta, kad po kultivacijos ECM baltymai (I tipo kolagenas ir fibronektinas) buvo nusodinti ląstelėse, kurios prasiskverbė per visą konstrukto storį.

Per pastaruosius dešimtmečius regeneracinė medicina kartu su audinių inžinerija gerokai patobulėjo, tačiau dabartiniai išradimai dar nėra tobuli ir turi savų trūkumų. Imunogeniškumas vis dar išlieka problema, todėl siekiama sukurti konstruktus, kurie būtų kuo geriau suderinami su vietiniais audiniais ir ieškomos tinkamiausios žaliavos. Šiuo metu, vis dar, daugelis šiuolaikinių efektyvių sprendimų atliekami tik laboratorijose ir nėra pritaikyti masinei gamybai [14]. Nors sveikų asmenų nedideli sužalojimai įprastai gyja gerai, didesni sužalojimai arba įvairios ligos, įskaitant amžių, infekciją ir vėžį, gali neigiamai paveikti gijimo procesą. Labai svarbu, kad sukurti nauji metodai būtų kuo paprastesni ir kuo universaliau pritaikomi visiems žmonėms. Be to, visa tai turi būti standartizuota ir pritaikoma visiems gaminiams, nuo tikslaus sterilizavimo, transportavimo iki implantavimo [18].

Tolimoje ateityje galima numatyti išmaniųjų biomedžiagų atsiradimą. Tikima, kad tokios medžiagos reaguos į įvairius signalus: temperatūrą, garsą, šviesą, drėgmę, pH ir fermentų aktyvumą. Reaguodamos į aplinkos ar išorinių dirgiklių pokyčius jos prisitaikys keisdamos savo fizines, chemines ir mechanines savybes. Be to, iš jų tikimasi formos atminties funkcijų, kad jos galėtų kontroliuoti sukurto audinio chemines ir mechanines savybes, įskaitant standumą, poringumą, ląstelių prisitvirtinimo vietas ir vandens įsisavinimą [16].

1.2. Audinių regeneracijai skirti polimeriniai karkasai

1.2.1. Regeneracinei medicinai skirtų polimerinių karkasų funkcijos

Vienas svarbiausių regeneracinės medicinos keliamų tikslų yra sukurti polimerinius konstruktus, kurie būtų kaip dirbtinė laikina ekstraląstelinė matrica, palaikanti naujo funkcionalaus audinio augimą. Idealiu atveju matrica turi būti pagrindu pažeidimo vietoje ir suteikti pradinę mechaninę atramą nuo fiziologinės apkrovos. Kad ląstelės proliferuotų ir diferencijuotų konstrukto paviršiuje, turi būti sudarytos palankios sąlygos, todėl konstruktas turi sukurti kuo panašesnę aplinką į natūralią [19]. Norint užtikrinti sėkmingą audinio regeneraciją, svarbu žinoti vietinio audinio sudėtį, struktūrą, mechanines savybes, medžiagų apykaitos mechanizmus bei suprasti kaip vyksta atitinkamo audinio regeneracinis procesas. Ląstelių prisitvirtinimas ir migracija per membraną yra pagrindiniai audinių formavimosi ir regeneracijos procesai, kurie slopina ląstelių apoptozę ir aktyvina citoskeleto reorganizaciją. Todėl pradinis ląstelių sukibimas su karkaso paviršiumi yra labai svarbus tolesniam ląstelių funkcionavimui [20]. Šį procesą sąlygoja tarpląsteliniai signalai, reguliuojantys ląstelių tarpusavio sąveiką bei sąveikas tarp ląstelių ir matricos. Sukibimo su substratu metu ląstelės jaučia tarpląstelinius signalus ir reaguoja į juos, todėl cheminiai ir fiziniai signalai konstruktuose turi būti pritaikyti taip, kad sukeltų specifinį ląstelių atsaką [21]. Pagrindiniai veiksniai sąlygojantys ląstelių likimą yra paviršiaus topografija ir chemija apimanti konstrukto funkcines grupes, paviršiaus krūvį ir biomolekules.

Audinių regeneracijai skirti konstruktai savo paviršiaus morfologija turi būti kuo geriau suderinami su natūralia mikroaplinka. Yra tyrimų [22,23,24], įrodančių hidrofiliškumo įtaką ląstelių elgsenai. Juose, teigiama, kad ląstelių sukibimas ir proliferacija ant hidrofiliškesnio paviršiaus yra didesnis. Hidrofilinės medžiagos pasižymi tuo, jog savo struktūroje turi amino, hidroksilo, karboksilo grupių, kurios yra polinės. Siekiant pagerinti konstrukto savybes ir ląstelių adheziją hidrofobinis konstrukto paviršius gali būti modifikuojamas apdorojant jį plazma, įterpiant augimo faktorius ar derinant skirtingas žaliavas. Apdorojimas plazma yra efektyvi priemonė, keičianti pluoštų paviršiaus fizines ir chemines savybes [21]. Tai patvirtino mokslininkų grupė [25] įvertinus paviršiaus modifikavimo poveikį fibroblastų adhezijai ir proliferacijai. Elektroverpimo būdu gautų poliglikolio rūgšties, polilaktido nanopluoštų paviršiai buvo chemiškai modifikuoti naudojant deguonies plazmos apdorojimą ir hidrofilinės akrilo rūgšties skiepijimą *in situ*. Ištyrus modifikuotus nanopluoštus nustatytas didesnis karboksilo grupių buvimas. Taip pat, nustatyta daug geresnė fibroblastų proliferacija ant modifikuotų nanopluoštų, kas rodo sėkmingą hidrofiliinių grupių atsiradimą. Kitas efektyvus būdas yra apdorojimas koncentruota druskos rūgštimi, kuris buvo įvertintas mokslininkų grupės jau 2004 metais [26]. Tyrimo metu elektroverpimu gauti poliglikolio rūgšties konstruktai buvo apdoroti koncentruota druskos rūgštimi ir įvertintas jų biologinis suderinamumas atliekant ląstelių proliferacijos tyrimus. Rezultatai parodė, kad rūgštimi apdorotuose konstruktuose ląstelių adhezija buvo didesnė.

Augimo faktoriai yra svarbios signalinės molekulės dažniausiai naudojamos kamieninių ląstelių dauginimuisi ir diferenciacijai skatinti. Vienas iš reikšmingiausių augimo faktorių, kuris turi įtakos ne tik fibroblastinei mezenchiminių kamieninių ląstelių diferenciacijai, bet ir proliferacijai yra – pagrindinis fibroblastų augimo faktorius (bFGF, angl. *Basic fibroblast growth factor*). bFGF dalyvauja embrioniniame vystymesi, angiogenezėje ir yra svarbus atstatant audinius. Be to, yra nustatyta, kad bFGF yra svarbus gydant žaizdas kremzlėje, odoje, ragenoje, ausies būgnelyje ir seilių liaukose [27]. Tiesioginis augimo faktorių tiekimas į tikslinę vietą yra ribotas, nes daugelis jų

pasižymi mažu stabilumu ir greitai inaktyvuojami fermentų fiziologinėmis sąlygomis. Be to, kaip ir daugumos augimo faktorių, bFGF pusinės eliminacijos laikas plazmoje yra trumpas ~ 3 min [28], o siekiant terapinio poveikio reikalingas pakartotinas tiekimas, kuris gali skatinti šalutinių poveikių atsiradimą. Šios aplinkybės paskatino kurti sistemas, galinčias išlaikyti augimo faktorius ilgesnį laiką. Įvairūs nanopluoštai gali veikti kaip ilgalaikė augimo faktorių saugykla, užtikrinanti kontroliuojamą augimo faktorių išsiskyrimą. Tai patvirtino mokslininkų komanda 2009 metais ištyrusi [27] augimo faktorių tiekimą nanopluoštais. Šiuo atveju buvo pagaminti dviejų tipų poli(L-pieno-ko-glikolio) rūgšties nanopluoštai su bFGF elektroverpimo ir koaksialinio elektros sukimo būdais. Gauti konstruktai galintys efektyviai išskirti bioaktyvų augimo faktorių per 1 – 2 savaites. O vertinant kaulų čiulpų kamieninių ląstelių prisitvirtinimą ir proliferaciją, nustatyta, kad elektroverpimu sukurtuose konstruktuose kolageno gamyba ir specifinių ECM baltymų genų ekspresija buvo didesnė – tai rodo fibroblastinę diferenciaciją.

Ne visi Maisto ir vaistų administracijos (angl. FDA, *Food and drug administration*) patvirtinti ir audinių inžinerijai naudojami polimerai turi reikiamas savybes biologiškai funkcionuoti vietoj prarasto audinio. Derinant kelis polimerus tarpusavyje galima reguliuoti galutinio konstrukto savybes. Skirtingomis savybėmis pasižymintys sintetiniai ir natūralūs polimerai gali keisti konstrukto paviršių, kas gali skatinti ląstelių sukibimą. Taip pat, gali būti kuriamos unikalios savybėmis pasižymintys medžiagos, išsaugant jų mechaninį tvirtumą. Be to, gautu polimerų mišiniu galima kontroliuoti lydymosi ir stiklėjimo temperatūras gamybos metu, kas gali supaprastinti patį procesą, įrangą bei išlaidas [29].

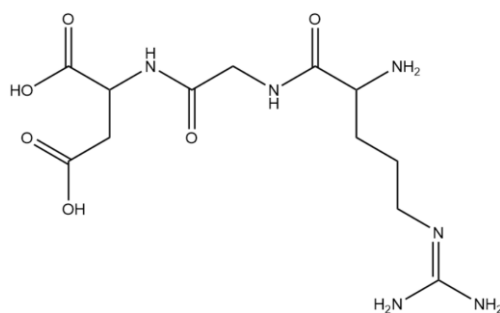
1.2.2. Regeneracinei medicinai skirtų polimerinių karkasų savybės

Sėkmingas konstrukto pritaikymas audinių inžinerijoje priklauso nuo daugelio jo savybių: biologinio suderinamumo, biologinio skaidumo, architektūros bei mechaninių savybių. Vienas iš svarbiausių audinių regeneracijai skirtų konstrukto kriterijų yra biologinis suderinamumas. Po implantacijos konstruktas turi sukelti neįdomią imuninę reakciją, kad būtų išvengta stipraus uždegiminio atsako, kuris gali lėtinti gijimą arba sukelti konstrukto atmetimą [30]. Todėl visos konstrukto savybės turi būti biologiškai suderinamos, nesukeliančios neigiamo atsako ir kuo tapatesnės prarastam audiniui. Medžiagos iš kurių gaminami konstruktai turi būti biologiškai suderinamos, skatinančios ląstelių adheziją ir migraciją. Konstruktai turi būti pagaminti pagal reikalaujamus Tarptautinės standartų organizacijos (ISO, angl. *International Organization for Standardization*) arba maisto ir vaistų administracijos standartus [31]. Kad būtų išvengta užterštumo įvairiais mikroorganizmais kiekvienam gaminiui, kuris implantuojamas į žmogaus kūną yra privaloma sterilizacija. Medžiagos naudojamos konstrukto gaminti turi būti lengvai sterilizuojamos ir atsparios sterilizavimo procesams, nesuyrančios [32]. Visa tai ne tik užtikrina pacientų saugumą, bet ir yra privaloma siekiant gaminių naudoti klinikinėje praktikoje.

Audinių inžinerijai naudojamų konstrukto architektūra yra labai svarbi. Sėkmingai audinių regeneracijai reikalingi tinkamo dydžio, paviršiaus šiurkštumo ir poringumo pluoštai tam, kad būtų sudaryta tinkama mikroaplinka. Mokslininkų [21] ištyrta žiurkių kalvarijų osteoblastų dauginimasis priklausomybė nuo paviršiaus šiurkštumo gradiento įrodė, kad osteoblastų proliferacija didėjo didėjant paviršiaus šiurkštumui. Tam, kad ląstelės pradėtų kurti savo tarpląstelinę matricą, jos turi prilipti, funkcionuoti, migruoti į paviršių, per karkasą ir pradėti daugintis. Ląstelės pirmiausia su konstrukto sąveikauja medžiagos paviršiuje per chemines grupes – ligandus. Konstruktai, susintetinti

iš natūralių tarpląstelinių medžiagų, natūraliai turi šiuos ligandus (argininas-glicinas-aspartas) (žr. 1.1 pav.), tačiau sintetiniams konstrukts reikia įtraukti juos [30].

Ląstelių elgsena konstrukto paviršiuje itin priklauso nuo jame esančių porų dydžio. Poros turi būti pakankamai didelės, kad ląstelės galėtų migruoti į struktūrą, susijungti su ligandais, tačiau, pakankamai mažos, kad veiksmingai prisijungtų. Tam, kad ląstelės prikibtų prie konstrukto paviršiaus, porų dydis turi būti didesnis nei ląstelių skersmuo (įprastai apie 10 μm). Porų dydžius galima suskirstyti į nanošūrkštumą <100 nm, mikrošūrkštumą, 100 nm – 100 μm ir makronelygumą 100 μm – 5 mm [20]. Skirtingi porų dydžiai gali turėti įtakos skirtingiems ląstelių procesams: buvo įrodyta [33], kad nano porų dydžio membranos yra svarbios kolageno skaidulų ir ECM susidarymui, o makroporos vaidina svarbų vaidmenį ląstelių sėjime, pasiskirstyme, migracijoje ir tolesnėje neovaskuliarizacijoje *in vivo*. Konstrukto poros, mažesnės už minimalų ląstelių skersmenį yra nereikalingos, nes ląstelės negali į jas įsiskverbti ir išnaudoti susidariusio papildomo paviršiaus ploto. Todėl gamybos metu svarbu parinkti tinkamus parametrus, kad suformuoto pluošto poros būtų pritaikytos tikslinėms ląstelėms [34].



1.1 pav. arginino-glicino-asparto rūgšties cheminė struktūra

Didelis poringumas yra būtinas, norint padidinti konstrukto paviršiaus plotą ir palengvinti konstrukto biologinį gyvavimą *in vivo* [19]. Tarpusavyje sujungtas porų tinklas yra būtinas, kad ląstelės galėtų migruoti per konstruktus ir taip skatintų audinių augimą. Audinių augimo metu porų tinklas leidžia pasiekti visas ląsteles ir aprūpinti jas būtinomis maistinėmis medžiagomis ir deguonimi [31]. Taip pat, poros turi būti pakankamai sujungtos, kad kraujas galėtų prasiskverbti, o galiausiai tokia konstrukcija paskatintų kraujagysles augti porų tinkle. Be to, poringa tarpusavyje sujungta struktūra reikalinga tam, kad atliekos galėtų išstrūkti iš konstrukto, o pluošto skilimo produktai galėtų būti pašalinti iš kūno nesutrukdant kitiems organams ir aplinkiniams audiniams [35].

Audinių inžinerijos užduotis yra leisti paties organizmo ląstelėms atkurti savo tarpląstelinę matricą iki pradinės būsenos ir funkcijos ilgainiui pakeičiant dirbtinį karkasą. Audinių inžinerijai naudojami konstruktai nėra nuolatiniai implantai, jie veikia kaip laikini substratai, todėl turi būti biologiškai skaidūs [30]. Degradacija yra procesas, kurio metu polimero grandinės nutrūksta ir keičiasi jų cheminė struktūra. Degradacija skirstoma į keturias fazes: vandens įsisavinimą, mechaninių savybių praradimą, molekulinės masės sumažėjimą ir masės praradimą [32]. Tinkami konstruktai turi būti rezorbuojami, kad organizme galiausiai neliktų jokių dirbtinės medžiagos buvimo pėdsakų. Todėl regeneracijai skirtų konstrukto tirpimo produktai turi būti tokie, kuriuos organizmas gali metabolizuoti. Taip pat svarbu, kad skilimo šalutiniai produktai būtų netoksiški ir galėtų būti pašalinti

iš organizmo fiziologiniais metaboliniais keliais, nepažeidžiant aplinkinių organų – per kvėpavimo ar inkstų sistemą [36].

Sintetinių polimerų metabolizmas vyksta paprastos hidrolizės būdu, kurios skilimo greitis kiekvienam žmogui nesiskiria, o tai yra vienas iš jų privalumų. Sintetiniai polimerai, tokie kaip poli(L-pieno rūgštis), poli(glikolio rūgštis) bei poli(L-pieno-ko-glikolio rūgštis) yra vieni iš nedaugelio biologiškai skaidžių polimerų, kuriuos FDA patvirtino klinikiniam naudojimui žmonėms. Šie polimerai yra poli(α -hidroksiesteriai), kurių skaidymas *in vivo* atsiranda dėl paprastos, nefermentinės poliesterio jungties hidrolizės. Hidrolizė nutraukia poliesterio ryšius atsitiktinėse polimero grandinių vietose, kol galiausiai susidaro pieno rūgštis ir glikolio rūgštis. Šios rūgštys natūraliai atsiranda žmogaus organizme, o susidariusios apdorojamos normaliais metabolizmo keliais [34]. Pašalinimas iš organizmo galiausiai pasiekiamas per kvėpavimo sistemą anglies dioksido pavidalu.

Kitas svarbus aspektas į kurį svarbu atsižvelgti yra tai, kad audinių gijimo greitis skiriasi priklausomai nuo amžiaus, konkretaus audinio ar jo vietos. Kadangi audiniai atsinaujina skirtingu greičiu, svarbu naudoti medžiagas, kurių skilimo greitis gali būti suderintas su konkretaus audinio atsinaujinimo laiku. Daugeliu atvejų medžiaga turėtų būti suprojektuota taip, kad ji visiškai suirtų, kai tik išskiriama pakankamai ECM, nes per greitas karkaso matricos irimas neleidžia susidaryti pilnam ir tvirtam audiniui. Tokiu būdu biomedžiaga veikia kaip atrama audinių vystymuisi, o ne kaip kliūtis regeneracijai [36]. Priešingai, per ilgą skilimo laiką sukelia nepilną pluoštinio audinio susidarymą aplink karkasą, išvengiant regeneracijos proceso [32]. Taip pat svarbu pritaikyti konstrukta atitinkamai amžiaus grupei. Pavyzdžiui, jauniems žmonėms lūžiai įprastai gyja iki svorio pakėlimo taško per maždaug šešias savaites, o visiškai mechaninis vientisumas grįžta tik praėjus maždaug vieneriems metams po lūžio, tačiau vyresnio amžiaus žmonėms visi gijimo procesai sulėtėja [30]. Konstrukto skilimo greitis priklauso nuo kelių veiksnių, įskaitant jų dydį, sudėtį, supančios terpės pH, žaliavų kristališkumą bei molekulinę masę [7]. Nemažai svarbu, kad medžiagos naudojamos konstrukto kūrimui būtų atsparios greitam skilimui ir būtų termostabilios. Todėl konstrukto skilimo greitis turi būti kontroliuojamas jų gamybos metu, kad jis kuo tiksliau atitiktų audinio augimo greitį po implantacijos.

Norint išverti dinamines transformacijas audinių formavimosi metu, taip pat reikalingas tinkamas mechaninis stiprumas [19]. Konstruktas turėtų turėti pakankamą mechaninį stiprumą, atitinkantį anatomicinę vietą, į kurią jis bus implantuojamas ir kurio pakanka atlaikyti bet kokius *in vivo* įtempimus. Rezorbuojamo konstrukto struktūra ir mechaninis vientisumas turi būti palaikomi tol, kol bus pilnai atkurtas audinys – nuo implantavimo iki remodeliavimo proceso pabaigos. Norint padidinti formuojamo pluošto tvirtumą galima jį kontroliuoti modeliavimo metu, parenkant atitinkamą gijų išsidėstymą [37].

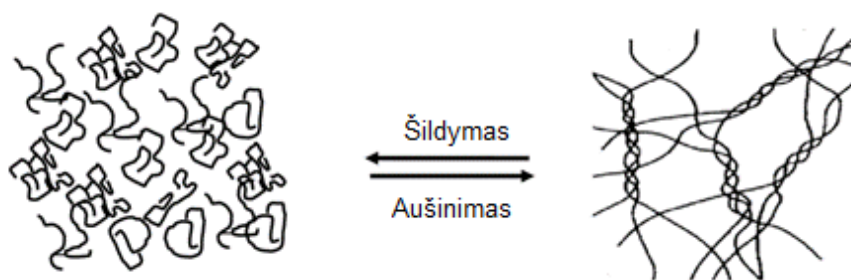
1.2.3. Regeneracinėje medicinoje naudojamos medžiagos

Pagrindinės trys biomedžiagų grupės – keramika, sintetiniai ir natūralūs polimerai yra naudojamos gaminant konstruktus audinių regeneracijai. Keraminiai konstruktai, hidroksiapatitas ir trikalcio fosfatas, dažniausiai naudojami pažeistiems kaulams atkurti [20]. Natūralūs polimerai, gauti iš atsinaujinančių išteklių – dumblių, augalų, gyvūnų ir mikroorganizmų, yra panašūs į natūralią ECM ir lengviau atpažįstami *in vivo*. Dėl savo panašumo, audinių regeneracijoje naudojami natūralūs polimerai gali padėti išvengti stiprių imunologinių reakcijų ir implanto atmetimo. Biopolimerai, kurie

yra kliniškai naudojami implantams gaminti, yra baltymai (šilko fibroinas, kolagenas, želatina, keratinas, fibrinogenas, elastinas ir aktinas), polisacharidai (chitozanas, chitinas, alginatas, gelano derva ir dariniai) ir glikozaminoglikanai (hialurono rūgštis) [38]. Vienas pagrindinių natūralių biopolimerų, kuriam skiriamas didelis dėmesys yra želatina. Sintetiniai polimerai pasižymi didesniu universalumu nei natūralūs polimerai, nes jų savybės galima lengvai pritaikyti prie konkrečios paskirties poreikių. Visos medžiagos turi tam tikrų trūkumų: keramika yra per kieta, sintetiniai polimerai – neskaidomi, o natūralūs polimerai gali pasižymėti prastomis mechaninėmis savybėmis. Todėl vienas iš pagrindinių šiuolaikinės audinių inžinerijos tikslų yra rasti geriausią biomedžiagą ar įvairios kilmės biomedžiagų derinius, kurie būtų biologiškai suderinami. Dažniausiai audinių inžinerijoje naudojami bioskaidūs sintetiniai polimerai: poliglikolio rūgštis, polilpieno rūgštis ir polikaprolaktonas. Be to, šie polimerai yra vieni iš nedaugelio sintetinių polimerų, kuriuos FDA patvirtino naudoti klinikiniam tikslams, todėl susidomėjimas jais sparčiai auga [15].

1.2.3.1. Želatina ir jos charakteristikos

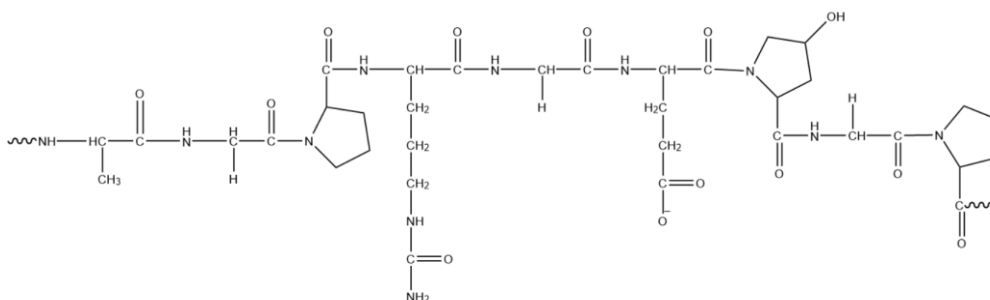
Vienas iš geriausiai ištirtų natūralių biopolimerų yra želatina. Tai yra permatomas, beveik beskonis ir bekvapis, trapus, lengvai virškinamas ir nealergizuojantis baltymas. Įprastai želatina yra miltelių arba granuliuotų pavidalo. Miltelių spalva priklauso nuo želatinos šaltinio, tačiau tai įprastai neturi įtakos jos savybėms [39]. Želatina naudojama daugelyje sričių, įskaitant maisto ir kosmetikos pramonę, farmacinius preparatus, fotografijos ir kitus techninius produktus. Terminiškai apdorojant želatiną, jos struktūra lengvai tirpsta į koloidus vos nuo 32 °C laipsnių, tačiau esant žemesnei nei 30 °C temperatūrai, ji tampa želė pavidalo [40]. Želatina yra lengvai prieinama ir gali būti išgaunama iš kelių šaltinių, pavyzdžiui, galvijų kaulų, žuvų, kiaulių ir galvijų odos. Keli želatinos, gautos iš įvairių šaltinių, biologinio suderinamumo tyrimai parodė, kad želatina nesukelia toksiškumo, antigeniškumo ir kito neigiamo poveikio žmogaus ląstelėms [41,42].



1.2 pav. Vėstanti želatina suformuoja gelio struktūrą [43]

Želatina yra dalinis kolageno darinys, kuris yra pagrindinis kremzlės, kaulų, odos ir jungiamojo audinio baltymas ir sudaro didžiąją gyvūnų ECM dalį [44]. Želatina yra mažiau organizuota, bet jos molekulinė sudėtis labai panaši į kolageno. Želatina, palyginti su jos pirmtaku, turi santykinai mažą antigeniškumą, tačiau ji vis dar išlaiko kai kuriuos informacinius signalus, kurie gali skatinti ląstelių adheziją, diferenciaciją ir proliferaciją, pavyzdžiui, arginino-glicino-asparto aminorūgščių seką, kuri yra integrino sukeltos ląstelės adhezijos atpažinimo seka. Dėl šios priežasties želatina pasižymi biologiniu aktyvumu, nes gali sukurti tinkamą aplinką ląstelėms gyvuoti. Be to, Želatina pasižymi įvairiomis naudingomis savybėmis: maža kaina, lengvu prieinamumu, biologiniu suderinamumu, bioskaidumu, netoksiškumu ląstelėms [45]

Gelio stiprumas ir klampumas yra svarbiausios fizinės želatinos savybės. Gelio stiprumas, taip pat žinomas kaip „Bloom“ vertė, yra želatinos stiprumo ir standumo matas, atspindintis jos sudedamųjų dalių vidutinę molekulinę masę ir taip pat priklauso nuo to, kokioje stadijoje želatina buvo ekstrahuota. Želatina, gauta pradiniuose ekstrahavimo etapuose, turi didesnę blogom vertę, palyginti su tomis, kurios visiškai hidrolizuojamos. Bloom vertė rodo želatinos stiprumą ir ji įprastai svyruoja nuo 30 iki 300 [39].



1.3 pav. Želatinos struktūrinė formulė [45]

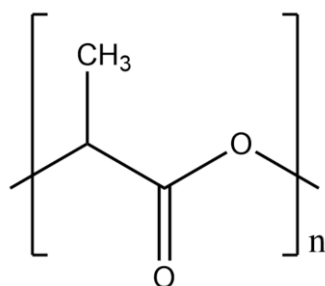
Želatina yra vienos grandinės baltymas, sudarytas iš unikalios aminorūgščių sekos. Želatinos aminorūgščių sudėtis yra panaši į jos pradinę žaliavą – kolageną, tačiau jos savybes lemia naudojamo kolageno šaltinis, gyvūno amžius, kolageno tipas (I ar IV) bei gamybos procesas. Ji gaunama negrįžtamai denatūruojant kolageną. Kolageno denatūravimas galimas taikant du procesus terminį apdorojimą ar hidrolizę. Terminio apdorojimo metu (esant ~ 40 °C) kolagenas denatūruoja, suardomi silpni vandeniliniai ir elektrostatiniai ryšiai kolageno fibrilinėje struktūroje, todėl spiralinė struktūra suskaidoma į vieną, dvi ar tris atsitiktinai paskirstytas polipeptidines grandines. Hidrolizinis procesas sukelia stiprių kovalentinių jungčių skilimą kolageno polipeptidinėse grandinėse šarminėmis arba rūgštinėmis sąlygomis. Rūgštinis procesas atliekamas mirkant kolageną praskiestame rūgštiniame tirpale ($\sim \text{pH } 4$), todėl susidaro A tipo želatina. Šarminio proceso metu susidaro B tipo želatina su mažiau priemaišų ir didesniu karboksilo grupių kiekiu [46]. Želatina, gauta iš kiaulių odos, įprastai vadinama A tipo želatina, o želatina, gauta iš galvijų odos – B tipo želatina [39]. Priklausomai nuo hidrolizės būdo, gauta želatina pasižymi skirtingomis savybėmis. Pasak Aramwit [47], B tipo želatinoje esančios nanodalelės turi didesnę kryžminio susiejimo laipsnį, todėl skilimo greitis yra lėtesnis, palyginti su nanodalelėmis A tipo želatinoje.

Remiantis literatūra, tiek kolagenas, tiek želatina, naudojami kaip nanopluošto komponentai, žymiai pagerina ląstelių infiltraciją, sukibimą, plitimą ir dauginimąsi ant gautų konstrukty. Ji gali būti naudojama kaip pagrindinis polimerų mišinių komponentas minkštųjų audinių regeneracijai. Želatinos biomedžiagos buvo naudojamos dirbtinei odai [48], kremzlėms [49] audinių inžinerijos tikslais. Natūralaus biopolimero įvedimas turi teigiamą poveikį, todėl yra atlikta nemažai tyrimų pagrindžiančių želatinos naudojimą kartu su kitais sintetiniais polimerais, padidinant sintetinio polimero biosuderinamumą ir kartu išlaikant medžiagos standumą [50]. Nepaisant želatinos privalumų ji pasižymi prastomis mechaninėmis savybėmis ir nėra termostabili. Tinkami karkasai turi būti pakankamai atsparūs, kad užtikrintų tam tikrą mechaninį implanto stabilumą, ir tuo pačiu metu jie turėtų lėtai irti, kad konstruktai būtų visiškai pakeisti naujai suformuotu audiniu. Palyginus su kolagenu, želatina yra labai jautri kelioms proteazėms, todėl ji gali greičiau skaidytis. Dėl grieto

skilimo tokia medžiaga neatitinka keliamų kriterijų ir negali būti naudojama audinių regeneracijai. Tačiau šiuos trūkumus galima lengvai pašalinti modifikuojant želatiną ir gaminant želatinos kompozitus, kad padidėtų medžiagos mechaninis stabilumas, biologinis suderinamumas ir biologinis aktyvumas [51].

1.2.3.2. Polipieno rūgštis ir jos charakteristikos

Polipieno rūgštis (PLA, angl. *Poly lactic acid*) yra termoplastinis alifatinis poliesteris, gaminamas iš pieno rūgšties, gaunamos iš kasmet atsinaujinančių išteklių. Kadangi pieno rūgštis yra chiralinė molekulė, turinti D ir L tipo izomerus, egzistuoja trys polipieno rūgšties formos: poli-L-pieno rūgštis, poli-D-pieno rūgštis ir poli-D,L-pieno rūgštis. Didžiąją dalį (99,5%) pieno rūgšties, gaunamos iš atsinaujinančių šaltinių, sudaro L-izomeras [52]



1.4 pav. Polipieno rūgšties struktūrinė formulė [[53]]

PLA yra bespalvis, blizgus, standus termoplastinis polimeras, kuris tirpsta daugumoje organinių tirpiklių – tetrahidrofurane, chlorintuose tirpikliuose, benzene, acetonitrile ir dioksane, tačiau netirpsta vandenyje, metanolyje, etanolyje [54]. Tai pusiau kristalinis polimeras, kurio kristališkumas ~37 %, stiklėjimo temperatūra ~67 °C ir lydymosi temperatūra ~180 °C. Jų apdorojimui reikalinga aukštesnė nei 190 °C temperatūra [55].



1.5 pav. Polipieno rūgšties granulės [56]

Palyginti su kitais biopolimerais, PLA turi daug privalumų:

- polimeras yra biologiškai suderinamas ir bioskaidus, todėl yra tinkamas naudoti biomedicinoje. PLA nesukelia toksinio ar kancerogeninio poveikio vietiniams audiniams. Be

to, jis skyla į netoksiškus šalutinius produktus ir gali būti lengvai derinamas su kitomis medžiagomis [57];

- PLA naudojimas yra labai tvarus, nes jo monomerai gaunami iš įvairių rūšių šalutinių žemės ūkio produktų, cukranendrių, kukurūzų, bulvių ar maniokos šaknų, o gamybai yra sunaudojamas anglies dioksidas. Be to, jis yra perdirbamas ir kompostuojamas. Natūralioje aplinkoje PLA skilimo laikas yra nuo šešių mėnesių iki dvejų metų, o kiti polimerai (polistirenas ir polietilenas) suskyla per 500 – 1000 metų [58];
- lyginant su kitais biopolimerais (polietilenglikolis, polikaprolaktonas), PLA yra lengviau apdorojama termiškai. Naudojant įprastus gamybos būdus, liejimą, plėvelės ekstruziją, 3D spausdinimą formavimą pūtimu, termoformavimą ir pluošto verpimą, nesunkiai gaminami įvairių dydžių ir formų PLA konstruktai [59]
- energijos taupymas. Išsiaiškinta, kad PLA gamybai reikia 25–55 % mažiau energijos nei naftos pagrindu pagamintiems kitiems polimerams [54].

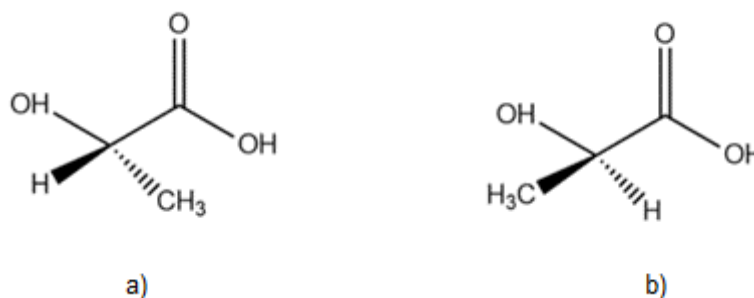
PLA yra universalus polimeras, kuris gali būti naudojamas pramoninių pakuočių gamyboje arba biomedicinos reikmėms. Dėl savo biologinės rezorbcijos, mažo toksiškumo, skilimo, biologinio suderinamumo ir naudingų mechaninių savybių jo buvimas medicinos srityje ir toliau auga. PLA naudojamas gaminant audinių inžinerijos konstruktus, vaistų tiekimo sistemas, dengiančias membranas, įvairius biologiškai absorbuojamus medicininius implantus, chirurginius siūlus [60]. Nepaisant visų privalumų, PLA taip pat turi keletą trūkumų, kurie riboja jo naudojimą. Hidrofobiškumas, reaktyvių funkcinių grupių trūkumas, didelis kristališkumas, prastas kietumas bei lėtas skilimo greitis yra pagrindiniai šio polimero trūkumai. Siekiant pašalinti šiuos trūkumus, PLA gali būti gaminamas derinant L- ir D-izomerų santykį, modifikuojamas, maišomas su kitais natūraliais arba sintetiniais polimerais, papildančiais polimerą geresnėmis savybėmis [15].

1.1 lentelė. Pieno rūgšties cheminės savybės [61]

Molekulinė formulė	$C_3H_6O_3$
CAS nr.	26100-51-6
Molinė masė	90,08 g/mol
Tankis	1,206 g/ml
Lydymosi temperatūra	L: 53,0 °C D: 53,0 °C D,L: 16,8 °C
Virimo temperatūra	122 °C, esant 15mmHG

Pieno rūgštis (LA, angl. *Lactic acid*) yra natūraliai susidarantis junginys žinduolių raumenyse glikogenolizės metu ir dalyvauja krebso cikle [62]. Pieno rūgštis gali būti gaminama dviem metodais: chemine acetileno, etileno, ekstrahuoto iš naftos sinteze ir angliavandenių fermentacija. Didžioji dalis ~90 % pasaulyje komerciškai pagaminamos pieno rūgšties išgaunama bakterinės fermentacijos būdu, o likusi dalis – hidrolizuojant laktonitrilą [15]. Bakterinė fermentacija atliekama naudojant homolaktinius organizmus – *Lactobacillus* genties padermes. Pieno rūgštis gaunama fermentuojant melasą, bulvių krakmolą, kukurūzų dekstrozę ar kitus angliavandenius, gautus iš atsinaujinančių išteklių. Todėl PLA yra ekologiškas produktas ir gali būti gaminamas ir naudojamas kaip aplinkai

nekenksminga medžiaga. Pieno rūgštis (2-hidroksipropiono rūgštis) yra organinė rūgštis, turinti asimetrinį anglies atomą ir PLA sudedamoji dalis [63]. Kadangi ji yra chiralinė molekulė, egzistuoja kaip du enantiomerai, L(+) arba D(-) stereoizomeras (žr. 1.6 pav.), kurie skiriasi savo poveikiu poliarizuotai šviesai [54] bei gali būti optiškai neaktyvi, raceminė forma – D(-) ir L(+) izomerų mišinys. Įpratai cheminės sintezės būdu paprastai susidaro D,L-pieno rūgštis, o optiškai gryna L(+)- arba D(-)-pieno rūgštis gaunama mikrobinės fermentacijos būdu, priklausomai nuo pasirinktos padermės. L-pieno rūgštis (>99,5 %) gaunamas fermentacijos būdu [57]. LA optinis grynumas yra labai svarbus, nes nedidelis kiekis kitų enantiomerinių priemaišų gali smarkiai pakeisti PLA savybes, tokias kaip kristališkumas arba biologinis skaidumas.



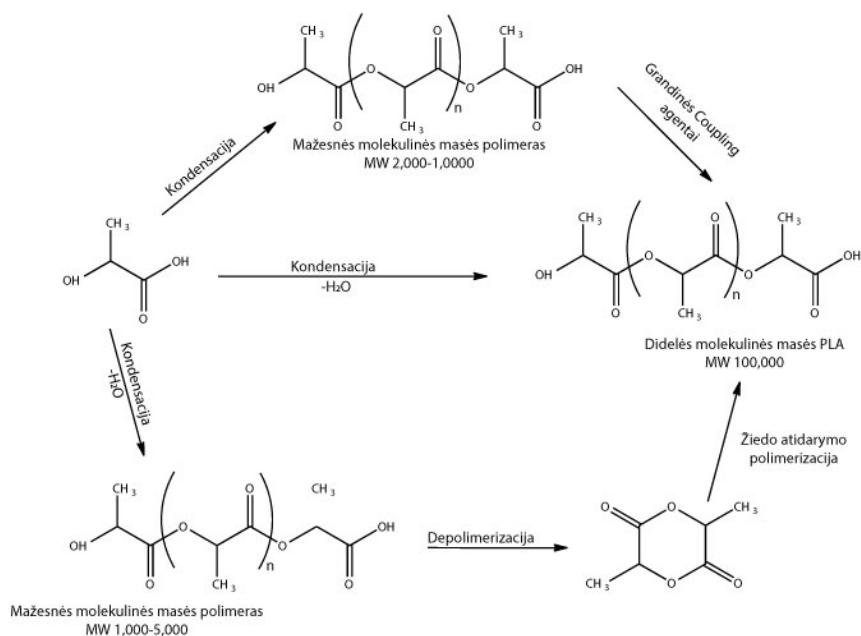
1.6 pav. Cheminės struktūros LA izomerų a – L-pieno rūgštis, b – D-pieno rūgštis [52]

PLA gamybą apima trys etapai:

- LA gamyba mikrobinės fermentacijos būdu;
- LA gryninimas ir ciklinio dimero (laktido) gavimas;
- PLA sintezė:
 - LA polikondensacija;
 - laktido žiedo atidarymo polimerizacija;
 - azeotopinė dehidratacinė kondensacija [54].

Tiesioginė LA polimerizacija ir laktido žiedo atidarymo polimerizacija yra dažniausiai naudojami PLA gamybos būdai, kurių gavimo schemas pateiktos 1.7 pav. LA polikondensacijos metu pieno rūgšties monomerų hidroksilo ir karboksilo grupės esterifikuojasi, kad vyktų laipsniško augimo polimerizaciją [64]. Polikondensacijos būdu yra sunku gauti didelės molekulinės masės polimerą, nes kiekviename polimerizacijos etape kaip šalutinis produktas susidaro viena vandens molekulė, o vanduo suardo besiformuojančią polimero grandinę ir susidaro mažos molekulinės masės PLA [55]. To galima išvengti procesą atliekant dideliame vakuume arba po reakcijos pridėdant grandinės sujungimo agentų. [57]. Viena iš alternatyvų tiesioginei LA polikondensacijai yra azeotropinis distiliavimas. Polikondensacijos metu į reakcijos mišinį įvedami organiniai tirpikliai, kad būtų lengviau pašalinamas vanduo. Laktido žiedo atidarymo polimerizacija (ROP, angl. *Ring-opening polymerization*), kaip parodyta 1.7 paveiksle, pirmiausia pradedama nuo pieno rūgšties oligomerizacijos, kurios metu pašalinus vandenį susidaro ciklinis pieno rūgšties dimeras – laktidas. Tuomet laktido žiedas polimerizacijos metu atidaromas ir metalo katalizatoriaus (dažniausiai naudojamas alavo oktanoatas) pagalba gaunamas didelės molekulinės masės PLA. Žiedo atidarymo

metodu gaunama didelės molekulinės masės PLA, gaminant be tirpiklių, nes kitu atveju taip pat susidaro vanduo [53]. Nors yra įvairių PLA gamybos būdų, nė vienas iš jų nėra lengvai įgyvendinamas. PLA sintezei reikalinga griežta sąlygų (temperatūros, slėgio, pH) kontrolė, katalizatoriai ir ilgas polimerizacijos laikas.



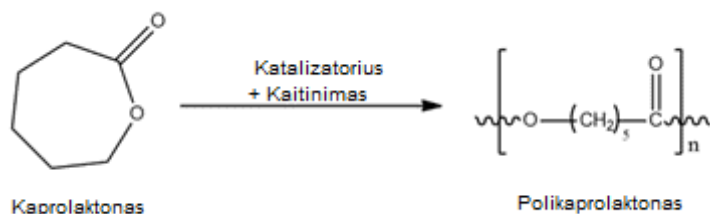
1.7 pav. PLA gavimo metodai [65]

Pagrindinis mechanizmas, kuriuo PLA skaidomas žmogaus kūne, yra esterio jungties hidrolizė, kuriai katalizuoti nereikia fermentų. Iš pradžių skaidymas vyksta amorfinėse dalyse, nes jose greičiau sugeriamas vanduo nei kristalinėse [55]. PLA skaidymas vyksta dviem etapais. Pirmiausia vyksta atsitiktinis nefermentinis esterių grupių grandinės nutrūkimas. PLA molekulinė masė sumažėja ir išsiskiria tirpūs LA oligomerai ir LA monomerai. Skaidymą toliau katalizuoja naujai susidariusios karboksilo grupės suskaidytų PLA grandinių galuose. Toliau molekulinė masė mažinama tol, kol pieno rūgšties ir mažos molekulinės masės oligomerai natūraliai metabolizuojami mikroorganizmų, kad galiausiai susidarytų anglies dioksidas ir vanduo. Hidrolizės metu, vykstant reakcijai, susidaro rūgščių grupės, kurios pagreitina reakciją [66]. Degradacija vyksta ne tik polimero paviršiuje, bet ir viduje, todėl susidaro vidinių ertmių, kas dar geriau paspartina degradaciją. PLA skilimo greičiui turi įtakos įvairūs veiksniai: drėgmė, temperatūra, pH bei PLA kristališkumo laipsnis, izomerų santykis, molekulinė masė, gaminio forma, poringumas ir dydis. Kadangi PLA skilimo greitis priklauso nuo pH, svarbu prieš konstruojant regeneracinį produktą atsižvelgti į tikslinę audinio aplinką. Nustatyta, kad PDLA skyla greičiau, nei PLLA [62]. Literatūroje pateikiamas PLA pusinės eliminacijos laikas *in vivo* yra 34 [67] savaitės į raumenis sušvirkštų L,D-PLA mikrosferų bei 24 mėnesiai [68] L-PLA varžtų implantuotų į blauzdikaulį.

1.2.3.3. Polikaprolaktonas ir jo charakteristikos

Polikaprolaktonas (PCL, angl. *PolyCaprolactone*) yra termoplastinis, biologiškai skaidus poliesteris, sudarytas iš pasikartojančių heksanoato vienetų. Kambario temperatūroje jis gerai tirpsta

chloroforme, dichlormetane, anglies tetrachloride, benzene, toluene, cikloheksanone ir 2-nitropropane, tačiau netirpsta alkoholyje, petroleteryje ir dietilo eteryje. Polikaprolaktonas gali būti sintetinamas 6-hidroksiheksano rūgšties polikondensacijos arba ciklinio monomero ϵ -kaprolaktono žiedo atidarymo polimerizacijos būdais. Žiedo atidarymo polimerizacijos mechanizmas klasifikuojamas pagal naudojamą katalizatorių: anijoninis, katijoninis, monomeru aktyvuotas arba koordinacinis-įterpiamasis. Kiekvienu metodu gaunamas skirtingos molekulinės masės, sudėties junginys [69]



1.8 pav. ϵ -kaprolaktono žiedo atidarymo polimerizacija [69]

Dėl penkių hidrofobinių $-\text{CH}_2$ fragmentų jo pasikartojančiuose vienetuose PCL skaidosi lėčiausiai iš visų poliesterių, atitinkamai $\text{PGA} > \text{PLA} > \text{PCL}$ [70]. Pirmiausia, PCL skilimas prasideda vandens difuzija į amorfinės sritis, o paskui į kristalines sritis. Tuomet hidrolizinis esterinių grupių skilimas lemia molekulinės masės mažėjimą (praradimą), o hidrolizės metu išsiskiriančios karboksirūgšties autokatalizuoja tolimesnį skaidymą. Be to, skilimą gali katalizuoti ir fermentai. Priklausomai nuo molekulinės masės, polimero kristališkumo laipsnio, morfologijos ir skilimo sąlygų PCL fiziologinėmis sąlygomis suirsta per 2 – 4 metus. Nepaisant to, skilimo greitis gali būti kontroliuojamas maišant PCL su kitais polimerais [71].

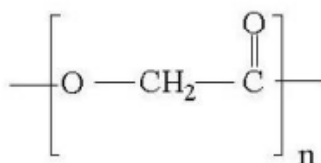
Tai baltas, pusiau kristalinis polimeras, kurio lydymosi temperatūra svyruoja nuo 59 iki 64 °C, o stiklėjimo temperatūra – 60 °C. Dėl santykinai žemos lydymosi temperatūros PCL gali būti lengvai apdorojamas įprastomis procedūromis ir iš jo formuojami įvairių konstrukcijų ir formų gaminiai. Esant fiziologinei temperatūrai PCL įgauna guminę būseną, dėl kurios jis pasižymi geromis mechaninėmis savybėmis ir ypatingai dideliu įtempimu trūkimo metu. PCL naudojamas poliuretanų, pakavimo medžiagų, kontroliuojamų vaistų tiekimo sistemų gamybose bei dėl ypatingai lėto skilimo ir tvirtumo PCL plačiai naudojamas gaminant ilgalaikius implantus, skirtus kaulinio ar kremzlinio audinio atkūrimui [70].

Nepaisant visų privalumų, PCL turi nepakankamą mechaninį stiprumą, o jo paviršius yra stipriai hidrofobinis. Tačiau PCL savybės gali būti lengvai keičiamos maišant polimerus ar įterpiant kalcio fosfatą, hidrogelius [72].

1.2.3.4. Poliglikolio rūgštis ir jos charakteristikos

Poliglikolio rūgštis (PGA, angl. *polyGlycolic acid*) yra biologiškai skaidus alifatinis poliesteris, gaunamas iš iškastinio kuro išteklių. Šis polimeras pasižymi itin dideliu mechaniniu stiprumu ir aukštomis dujų barjerinėmis savybėmis. Dėl didelio kristališkumo (46 – 50 %) PGA netirpsta daugumoje organinių tirpiklių, išimtis yra itin fluorinti organiniai tirpikliai, tokie kaip heksafluorizopropanolis. PGA stiklėjimo ir lydymosi temperatūros yra atitinkamai 36 °C ir 225 °C. Dėl didelio temperatūrų skirtumo formavimo procesas yra sudėtingesnis. Dėl netinkamai parinktų sąlygų gali kilti formavimo ar gaminio išvaizdos problemų [73]. Nors šį polimerą galima susintetinti

ir polikondensacijos būdu, tačiau šis būdas taikomas retai, nes gaunamas nenaudingas mažos molekulinės masės polimeras pasižymintis prastomis mechaninėmis savybėmis. Didelės molekulinės masės PGA gaunama glikolido žiedo atidarymo polimerizacija. Reakcija katalizuojama naudojant stibio, cinko ar alavo katalizatorius. Nepaisant to, PGA gamyba išlieka itin brangi. Dėl natūralaus skilimo produkto – glikolio rūgšties, jis sulaukia daug dėmesio medicinoje. Daugiausia PGA panaudojama rezorbcinių siūlių gamyboje, tačiau taip pat naudojama naftos ir dujų gręžiniams ardyti, sandarinti [74].



1.9 pav. Poliglikolio rūgšties cheminė struktūra [74]

PGA *in vivo* skaidoma hidrolizės būdu, kuri vyksta dviem etapais: pirmiausia vyksta vandens difuzija į amorfinės polimero sritis ir atsitiktinai suyra esterinės grupės. Antrasis skilimo etapas daugiausia apima kristalines polimero sritis, jo metu, sritis atsiveria ir polimerinė grandinė trūksta. Prie skaidymo prisideda ir tam tikri fermentai, ypač turintys esterazės aktyvumo. Susidaręs skilimo produktas – glikolio rūgštis, gali sukelti vietinės rūgšties koncentracijos padidėjimą, o tai gali sukelti nepageidaujamą uždegiminį atsaką ar pažeisti audinius. Galutinis glikolio rūgšties likimas *in vivo* laikomas anglies dioksidu ir vandeniu, pašalinimu iš organizmo per kvėpavimo sistemą ar su šlapimu. PGA visiškai suyra maždaug per 12 mėnesių. Dėl staigaus skilimo, PGA praranda savo mechaninį vientisumą per 2 – 4 savaites [75].

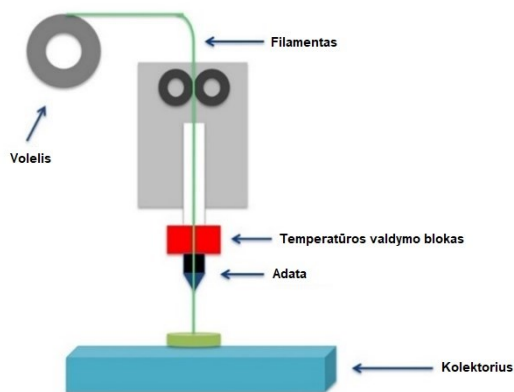
1.3. Polimerinių trimačių konstruktyvų gamybos būdai

Trimatis spausdinimas yra šiuolaikinė technologija, kurianti 3D objektus nuosekliai nusodinant valdomus medžiagos sluoksnius. Technologija yra labai universali, nes ja galima spausdinti tokias medžiagas kaip polimerinės dervos, metalai, plastikai ar gumos. 3D spausdinimas yra viena iš lanksčiausių technikų, leidžiančių tiesiogiai gaminti sudėtingas konstrukcijas, todėl vaidina svarbų vaidmenį audinių inžinerijoje. Be to, dažnai technologija gali būti pritaikyta individualiai naudojant klinikines vaizdo atkūrimo technikas. Siekiant patenkinti audinių inžinerijos reikalavimus, pastaraisiais metais, buvo sukurta įvairių konstruktyvų gamybos metodų. Priklausomai nuo medžiagų ir gamybos procesų, pagrindinės naudojamos 3D spausdinimo technologijos yra lydžios masės modeliavimas, stereolitografija, selektyvus kietinimas lazeriu, biospausdinimas ir elektroverpimas [76].

1.3.1. Lydžios masės modeliavimas

Lydžios masės modeliavimas (FDM, ang. *Fused deposition modeling*) yra paprasčiausia 3D spausdinimo technika, kai polimerų gijos nusodinamos ant kieto pagrindo. FDM proceso metu polimerinis siūlas kaitinamas ir išspaudžiamas per šildomą antgalį ant platformos. Pasiekęs platformą polimeras kietėja, o nenutrūkstamas procesas kartojamas kol gaunama 3D struktūra. Antgalio padėtis yra valdoma kompiuterine programa ir juda plokštumoje, kad būtų sukurta norima forma. Šis metodas patrauklus dėl naudojamos medžiagų įvairovės, tačiau pagrindinis apribojimas, medžiagos turi būti

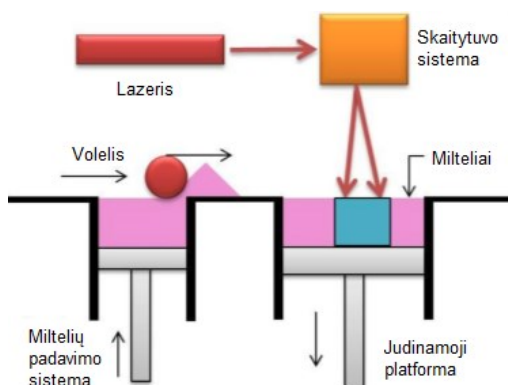
termostabilios [77]. Dėl to ši technologija naudojama įvairiose srityse, įskaitant automobilių, aviacijos pramonę ir biomediciną. Dažniausiai audinių inžinerijos konstruktais gaminti FDM metodu pasirenkamas poliesteris, PCL ir jo kompozitai. Tai ekonomišką, paprastą ir greitą 3D konstrukto gamybos būdą, kuriame nenaudojami toksiški tirpikliai. Procesas turi trūkumų – yra prastos skiriamosios gebos, todėl galimas polimerinės medžiagos terminis skilimas. Be to, dėl per aukštos polimero apdorojimo temperatūros konstrukto negalima ruošti su gyvomis ląstelėmis [78].



1.10 pav. Lydžios masės modeliavimo proceso schema [79]

1.3.2. Selektyvus kietinimas lazeriu

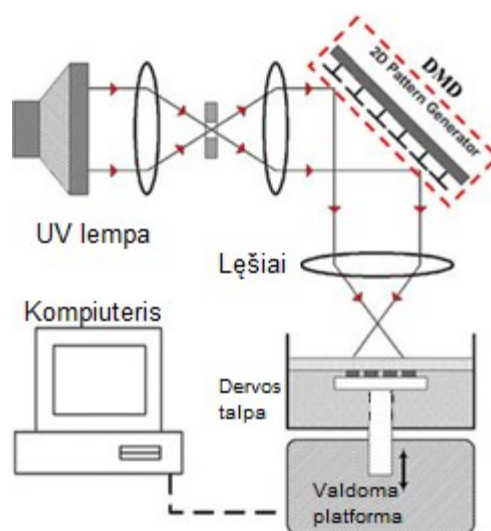
Selektyvus kietinimas lazeriu (SLS, angl. *Selective laser sintering*) yra 3D spausdinimo technologija, kuria 3D konstruktai kuriami miltelių pagrindu. 1.11 paveiksle pateikta SLS proceso schema, kurią sudaro lazeris, skaitytuvo sistema, volelis bei miltelių tiekimo sistema. SLS spausdinimo metu, lazerio spindulio judėjimas yra valdomas kompiuteriu pagal užprogramuotą kelią. CO₂ lazerio spindulys įkaitina polimerinių miltelių daleles virš polimero stiklėjimo temperatūros ir išlydo ploną medžiagos sluoksnį [80]. Dėl molekulinės difuzijos, dalelių paviršiuje jos susilieja į vientisą tvirtą medžiagą. Pagaminus vieną sluoksnį, platforma pasislenka žemyn, o ant viršaus voleliu paskleidžiamas naujas miltelių sluoksnis. Procesas kartojamas tol, kol pastatoma galutinė konstrukcija. Šiam metodui būdingas platus žaliavų pasirinkimas. Audinių inžinerijai ruošiami konstruktai iš polietileno, polikaprolaktono, polivinilo alkoholio ir polipieno rūgšties. Svarbu, kad naudojamos medžiagos būtų termostabilios ir nepakistų veikiant stipriu lazeriu. Nors ir lazerio skiriamoji geba didelė, tačiau šiuo metodu gaunami mažo poringumo konstruktai, o tai neatitinka audinių regeneracijai keliamų reikalavimų [81].



1.11 pav. Selektyvaus kietinimo lazeriu proceso schema [80]

1.3.3. Stereolitografijos technologija

Stereolitografija (SLA, angl. *Stereolithography*) yra 3D struktūrų kūrimo metodas, kuriame naudojamas sluoksnis po sluoksnio metodas, pagrįstas erdviu būdu kontroliuojamu skystų dervų kietėjimu fotopolimerizuojant. SLA spausdinimui naudojamos skystos, mažo klampumo medžiagos vadinamos dervomis, kurios yra jautrios ultravioletinei šviesai ir jos poveikyje fotochemiškai kietėja [82]. 1.12 paveiksle pavaizduota stereolitografinio proceso schema. Pagrindiniai jos komponentai yra dervos rezervuaras, kompiuteriu valdoma atraminė platforma ir ultravioletinės šviesos šaltinis. Stereolitografijos metu ultravioletinė šviesa fokusuojama į indą su skysta fotopolimerine derva. Laisvieji radikalai ir kitos reaktyvios rūšys susidaro sužadinus fotoiniatorių molekules ultravioletine šviesa, derva polimerizuojasi ir gaunama kietą medžiagą. Kompiuteriu valdoma platforma reguliuoja dervos kiekį ant jos, o dervos kietėjimo gylis nustatomas reguliuojant šviesos šaltinio galią. Kai pirmas sluoksnis polimerizuojamas, platforma perkeliama tam tikru žingsniu, o paviršius vėl padengiamas skysta derva ir polimerizuojamas sekantis sluoksnis. Kadangi kietėjimo gylis yra šiek tiek didesnis nei platformos pakopos aukštis, užtikrinamas geras sukibimas su pirmuoju sluoksniu. Šie žingsniai kartojami, kol sukuriama vientisa trimatė struktūra. Gauta struktūra nusausinama, nuplaunamas dervos perteklius tirpikliu, o kad būtų užbaigtas polimerizacijos procesas ir pagerintos konstrukcijos mechaninės savybės trimatė struktūra kietinama UV šviesa [83].

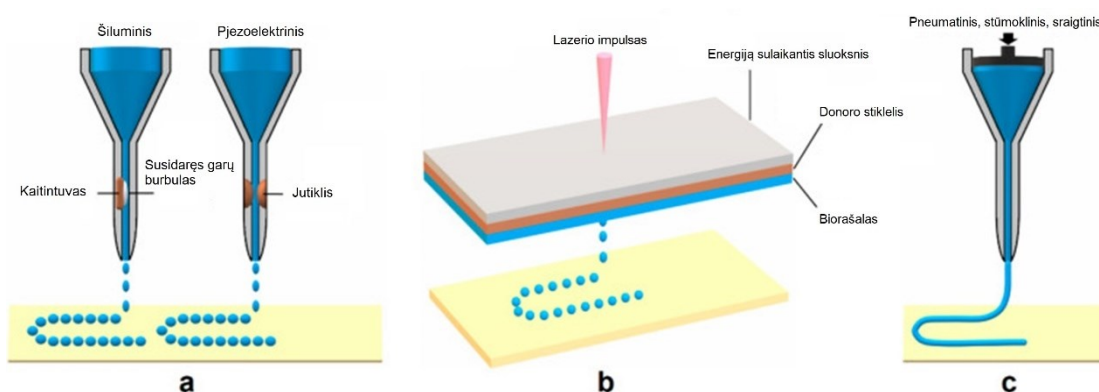


1.12 pav. Stereolitografinio proceso technologijos schema [83]

Stereolitografija plačiai naudojama medicinoje kuriant tikslus implantus, pagalbines priemones operacijoms ir specialiai pritaikytas pacientams dalis, pavyzdžiui, klausos aparatus. Dėl galimybės naudoti duomenis iš klinikinių nuskaitymo metodų, tokių kaip kompiuterinė tomografija ir magnetinio rezonanso tomografija, ši gamybos technologija ypač naudinga biomedicinos inžinerijoje. Procesas yra ypač universalus, juo pagaminami tvirti konstruktai su tiksliai apibrėžtu porų dydžiu, poringumu, porų pasiskirstymu ir sujungimu. Palyginti su kitais 3D spausdinimo procesais, stereolitografija pasižymi didžiausiu gamybos tikslumu, procesu galima pasiekti 0,01 mm skiriamąją gebą [82]. Nors SLA yra greitas ir itin tikslus metodas, jis turi trūkumų, vienas jų – procesas yra brangus. Ribotas dervų pasirinkimas, kurios tinkamos perdirbti stereolitografijos būdu yra pagrindinis šios technikos apribojimas. SLA technologijai dar nesukurtos jokios biologiškai skaidžios ar kompostuojamos dervos. Be to, fotopolimerai yra lipnūs, todėl pagamintus konstruktus papildomai reikia plauti toksiškais tirpikliais, kietinti ir džiovinti [84,85].

1.3.4. Biospausdinimo technologija

Biospausdinimas yra nauja biomedicininė struktūrų spausdinimo technologija, naudojant gyvybingas ląsteles, biologines molekules ir biomedžiagas. Kitaip tariant, tai biologinės medžiagos nusodinimas sluoksniu po sluoksnio, siekiant sukurti į organus panašias 3D struktūras, leidžiančias gyvoms ląstelėms dauginis. Ląstelių, maistingų medžiagų ir matricos mišinys, kartu sudaro biorašalą. Kiekviena biospausdinimo technika naudoja hidrogelius kaip biorašalo pagrindą. Hidrogeliai yra medžiagos, turinčios 3D molekulinis tinklus, kurios turi daug vandens, o didelis vandens kiekis leidžia ląstelėms įstrigti, augti ir didėti. Biospausdinimu sukonstruoti prototipai apdorojami bioreaktoriuose, kad būtų atkurta reikalinga *in vivo* aplinka ir išlaikytas audinių gyvybingumas brendimo laikotarpiu [86]. Vienas iš pagrindinių biospausdinimo pranašumų yra vienodas ląstelių pasiskirstymas. Tačiau tinkamų biomedžiagų pasirinkimas šiam procesui yra labai ribotas, o pats procesas yra sudėtingas ir brangus.



1.13 pav. Biospausdinimo metodai: a – rašalinis biospausdinimas; b – lazerinis biospausdinimas; c – ekstruzinis biospausdinimas [86]

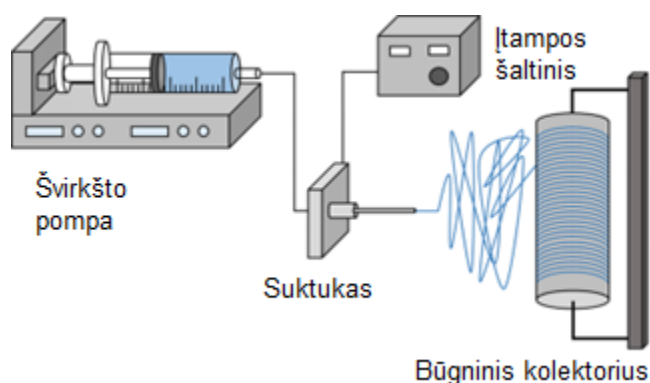
Yra trys pagrindiniai metodai, naudojami biologinėms medžiagoms nusodinti ir modeliuoti: rašalinis, lazerinis ir ekstruzinis biospausdinimas, kurie pavaizduoti 1.13 paveiksle. Rašalinio biospausdinimo metu, biorašalo lašeliams išstumti naudojamos šiluminės, pjezoelektrinės arba elektromagnetinės jėgos. Biorašalas tai mažo klampumo hidrogelio polimerinis tirpalas su kapsuliuotomis ląstelėmis. Biorašalas lašelių pavidalu nuolat išpurškiamas ant platformos iš anksto suplanuotuose taškuose, kol sluoksniu po sluoksnio suformuojama galutinė 3D konstrukcija. Spausdintuvo galvutė naudoja šiluminę arba pjezoelektrinę jėgą, kad sukurtų reguliuojamo dydžio lašus. Nors metodas greitai atlieka biospausdinimą, tačiau lašelių kryptingumas nėra tikslus bei dėl didelio ląstelių tankio galimas dažnas purkštukų užsikimšimas. Ekstruzinis biospausdinimas yra dažniausiai naudojama spausdinimo technika, kurio metu biorašalas iš kasetės išspaudžiamas per spausdinimo galvutę, taikant slėgį pneumatiniu, stūmokliniu arba sraigtinu metodu. Biorašalas išstumiamas plonų gijų pavidalu ir nusodinamas ant pagrindo pagal nustatytą judėjimo padėtį ir kelią. Pagrindinis šios technikos pranašumas yra galimybė nusodinti didelio tankio ląsteles ir itin klampias medžiagas, o tai padidina biorašalo pasirinkimo spektrą [87]. Tačiau, palyginus su kitais biospausdinimo metodais, šis metodas turi mažą skiriamąją gebą. Be to, spausdinimo metu galima ląstelių apoptozė. Didelis ekstruzijos slėgis sukelia didelį šlyties įtempį biorašalo komponentams ir gali paveikti ląstelių gyvybingumą bei iškraipyti audinių struktūrą.

Lazerinis biospausdinimas naudoja lazerį kaip energijos šaltinį biomedžiagoms nusodinti ant pagrindo. Įrangą sudaro trys pagrindinės dalys: imtuvas, pulsuojantis lazeris ir donoro stiklis, kurį

iš viršaus dengia energiją sugeriantis sluoksnis (pagamintas iš titano arba aukso), o iš apačios biorašalo sluoksnis. Procesas priklauso nuo lazeriu sukulto energiją sugeriančio sluoksnio, dengiančio donoro stiklėlių, garinimo efekto. Garinimo metu susidaro aukšto slėgio burbulas, kuris lašelių pavidalu nukreipia biorašalą ant imtuvo. Naudojant lazerio impulsus procesas kartojamas, kol sukuriama 3D struktūra. Šio metodu ląstelėms nesukeliami mechaniniai įtempiai, nepakenkiant jų gyvybingumui ir funkcijoms. Kita vertus, procesas trunka ilgai, o per didelę šilumą, susidaranti dėl lazerio energijos, gali pažeisti ląsteles ir paveikti jų gyvybingumą atspausdintame audinyje [88].

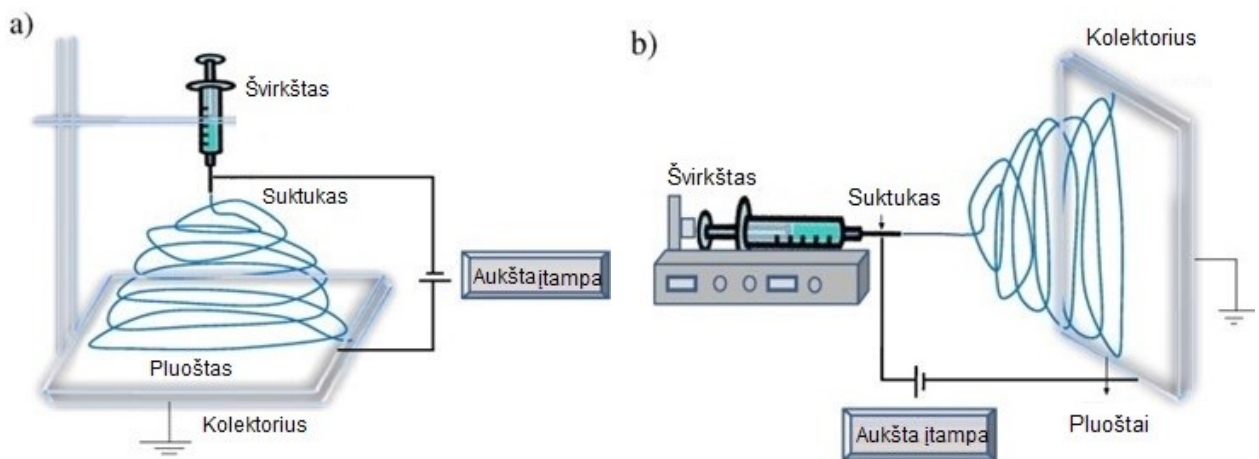
1.3.5. Elektroverpimo technologija

Elektroverpimas yra gamybos metodas, apimantis elektrostatiu būdu varomą procesą, naudojamą itin smulkiems pluoštams gaminti. Nors elektroverpimo sąvoka žinoma jau beveik šimtmetį, polimeriniai nanopluoštai, pagaminti elektroverpimo būdu, didelio susidomėjimo tema tapo tik pastarąjį dešimtmetį. Šių pluoštų skersmuo įprastai svyruoja nuo nanometrų iki dešimčių mikrometrų, o tokio įvairaus pluoštų skersmens diapazono neįmanoma pasiekti įprastiniais metodais. Elektroverpimu gautų trimačių pluoštų pranašumas – didelis paviršiaus ir tūrio santykis, o tokia mikroaplinka, užtikrina ląstelių sukibimą ir vystymąsi [89]. Elektroverpimas suteikia galimybę naudoti platų polimerų asortimentą, įskaitant natūralius, sintetinius polimerus bei junginius, kurių sudėtyje yra neorganinių medžiagų [19]. Vienas pagrindinių elektroverpimo technikos privalumų yra jo universalumas, nes nesunkiai keičiant proceso sąlygas galima kontroliuoti pluošto storį ir poringumą. Šiuo metu elektroverpimo būdu gauti pluoštai kuriami ne tik smulkiam filtravimui ir apsauginiams drabužiams, bet ir vaistų tiekimo sistemoms, didelio našumo baterijų membranoms bei žaizdų gijimo tvarsčiams. Kadangi jų struktūra imituoja natūralų audinį, pluoštiniai karkasai yra potencialios biomedžiagos audinių regeneracijai [90].



1.14 pav. Tirpalo elektroverpimo proceso technologijos schema su būgniniu kolektoriumi [91]

Galima išskirti du skirtingus elektroverpimo tipus: tirpalo elektroverpimas ir lydalo elektroverpimas. Abu metodai yra panašūs, tačiau skiriasi polimero kietėjimo mechanizmu bei gaunamų pluoštų morfologija. Pirmuoju atveju polimerai ištirpinami chloroforme ar dimetilformamide ir patalpinami į dozuojamą švirkštą. Polimero tempimo etape, pakeliui link kolektoriaus, tirpale esantis tirpiklis išgaruoja, palikdamas sausą polimero tinklėlį ant kolektoriaus paviršiaus [7]. Šiuo būdu pluoštus galima surinkti ant stacionaraus arba besisukančio metalinio kolektoriaus, kaip pavaizduota 1.14 paveiksluose. Proceso trūkumas yra citotoksinis tirpiklio likutis pluoštuose. Tokių pluoštų taikymas biomedicinoje gali būti nepalankus ląstelių kultūrai. Nors dėl tirpiklio gaunami žymiai smulkesni pluoštai, tačiau šiuo atveju galimas tik atsitiktinis pluošto nusėdimas [92,93].

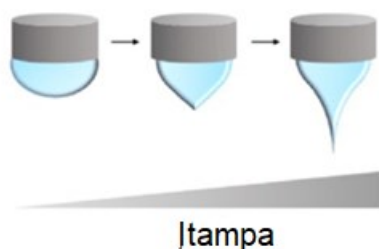


1.15 pav. Elektroverpimo proceso technologijų schemas; Surinkimo būdai: a – vertikalus elektroverpimas, b – horizontalus elektroverpimas [94]

Lydalo elektrinis verpimas (MES, angl. *melt electrospinning*) yra pluošto formavimo technika iš polimerų lydalo, apjungianti 3D spausdinimo ir elektrinio verpimo principus. Tai žalias, be tirpiklių metodas, kurio metu polimero lydalas atvėsta ir sukietėja keliaujant link arba ant kolektoriaus. Kadangi polimero tirpinimas organiniuose tirpikliuose ir jų pašalinimas nereikalingas, sumažėja citotoksiškumas, pluoštai yra tinkamesni naudoti medicinoje. Be to, metodas gali būti atliekamas tipiškame laboratoriniame stende, nereikalaujant vėdinimo sistemos, o tai sumažina proceso kainą [95]. Polimero kietėjimas priklauso nuo atstumo iki kolektoriaus, aplinkos temperatūros bei polimero lydymosi temperatūros. Dėl mažesnio surinkimo atstumo, lydalo elektroverpime gijos gali nusėsti dar nesukietėjusios ir susiliesti. Toks sujungtas pluošto poringumas padeda ląstelių migracijai ir maistinių medžiagų bei deguonies tekėjimui struktūroje. Šis metodas suteikia galimybę apdoroti polimerus, kurių negalima ištirpinti jokiam tirpiklyje bei naudoti kompleksines medžiagas, kurioms neįmanoma rasti bendro tirpiklio. Taip pat, metodas suteikia būdą tiesiogiai ir tiksliai nusodinti pluoštus pagal iš anksto užprogramuotą kodą. Lyginant su tirpalo elektroverpimu, lydalo elektroverpimo procesas leidžia geriau kontroliuoti ištirpusio polimero kelią, nes polimero lydinys, turi daug didesnę klampą ir mažesnę laidumą, nusodinimo metu sukelia stabilesnę srovę. Šis metodas yra techniškai sudėtingesnis, todėl literatūros susijusios su lydalo elektroverpimu yra ženkliai mažiau, tačiau pastaraisiais metais šio metodo populiarumas auga [96]

Lydalo ir tirpalo elektroverpimo procesų schemas pateiktos 1.15 paveiksle. Įranga gali būti konstruojama vertikaliai arba horizontaliai. Pagrindiniai įrangos komponentai yra tiekimo kamera, pro kurią tiekiamas polimero filamentas, šildymo sistema, purškimo adata arba švirkštas, aukštos įtampos energijos šaltinis ir kolektorius. Elektroverpimo metu tarp purškimo antgalio ir įžeminto kolektoriaus, naudojant maitinimo šaltinį ir elektrodus, sukuriama aukštos įtampos elektrinis laukas. Kolektorius turi būti laidus, o dažniausiai naudojama vario, aliuminio arba žalvario plokštelė. Aukšta įtampa yra prijungta prie kaitinamos adatos arba švirkšto, pro kuriuos polimeras išleidžiamas pasirinktu greičiu. Pradžioje dėl paviršiaus įtempimo polimeras kaupiasi švirkšto arba adatos gale, susidaro pusrutulio formos polimero tirpalo lašas. Stiprėjant elektriniam potencialui, didėja polimero lašelio paviršiaus krūvis, kol adatos gale polimeras deformuojasi, pailgėja ir susidaro kūgio forma, vadinama Teiloro kūgiu (žr. 1.16 pav.) [12]. Tolesnis elektrinio lauko didėjimas link slenkstinės vertės sukelia elektrifikuotos polimero čiurkšlės susidarymą, nes atstumianti elektrostatinė jėga įveikia paviršiaus įtampą. Įkrauta polimero srovė traukiama nusėda ant įžeminto metalinio kolektoriaus. Prieš pasiekiant kolektorių, įkrauta polimero srovė patiria lenkimo nestabilumą ir

palaispniui dar geriau plonėja. Kad būtų kompensuotas nestabilumas, srovė išsiskaido į daugybę gijų sukurdamas srovės plakimo judesius. Taip gaunami atsitiktinai orientuoti nanopluoštai neaustinio audinio pavidalu [4].



1.16 pav. Teiloro kūgio susiformavimas didėjant įtampai [12]

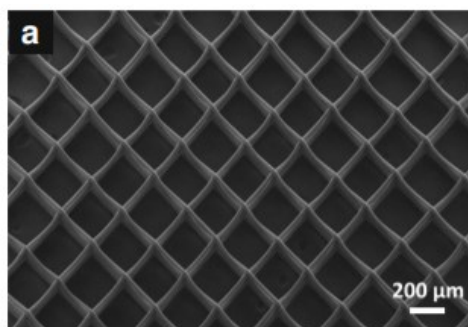
1.4. Suformuotų polimerinių matricių tyrimų apžvalga

Fuchs'as ir kiti [97] panaudojo lydalo elektroverpimo metodą gaminant karkasus, skirtus burnos ir žandikaulių chirurgijai, siekiant pagerinti žaizdų gijimą. Visų konstrukčių gamybai pasirinktas naudoti medicininis PCL, kuris buvo padalytas į 50 ml tūrio švirkštus argono atmosferoje ir iki panaudojimo laikytas 80 °C temperatūroje, kad iš lydalo pasišalintų oro burbulai. Elektroverpimo sąlygos pateiktos lentelėje žemiau (žr. lentelė 1.2). Karkasų formavimas buvo atliekamas esant 21,4 °C ± 0,4 °C aplinkos temperatūrai ir 38,5 ± 3,5 % drėgmės lygiui. Galiausiai bandiniams nuo metalinio kolektoriaus atskirti buvo naudotas etanolis. Tokiu būdu buvo pagaminti PCL bandiniai su dėžutės formos poromis, kurių dydis buvo atitinkamai 225 μm, 300 μm, 375 μm, 450 μm ir 500 μm.

Lentelė 1.2. Elektroverpimo sąlygos [97]

Parametras	Vertė
Temperatūra	73,0 °C ± 1,0 °C
Slėgis	1,2 bar
Įtampa	6 kV
Atstumas tarp kolektoriaus ir adatos	4 mm
Greitis	400 mm/min

Visų skirtingų mėginių porų morfologija ir proceso tikslumas įvertintas naudojant skenuojančią elektroninę mikroskopiją (SEM, angl. *Scanning Electron Microscope*). 1.17 paveiksle galima pamatyti tikslų PCL pluošto išdėstymą, kurio porų dydis 250 μm. Siekiant įvertinti, kuris porų dydis geriausiai skatina ląstelių augimą, taip pat buvo tiriamas burnos minkštųjų ir kietųjų audinių MG63 ląstelių augimas ant pagamintų mėginių. Ląstelių augimas buvo įvertintas atliekant WST-1 tyrimus, matuojant baltymų koncentraciją ir skaičiuojant ląsteles skirtingais laiko momentais. Tyrimas parodė sėkmingą gyvybingų ląstelių proliferaciją visuose PCL konstruktuose. Nors visų konstrukčių matmenys buvo vienodi, nustatyta, jog mažesnio dydžio porų (t.y. 225 μm) mėginiuose aptikta daugiausia ląstelių ir didžiausia baltymų koncentracija.



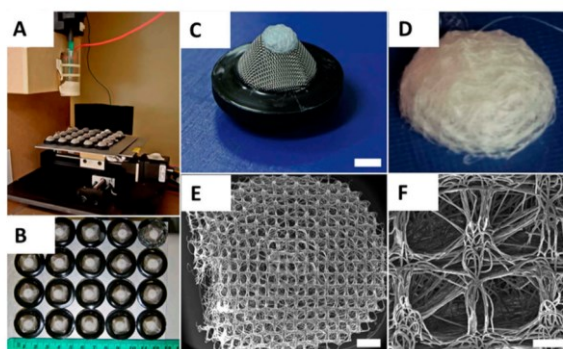
1.17 pav. PCL pastolių SEM fotografija, 225 μm porų dydis [97]

S. Zaiss'as ir kiti [98] naudojant lydalo elektroverpimo metodą pagamino PCL karkasus ant struktūrizuotų elektrolaidžių kolektorių. Mokslo grupės tikslas buvo paruošti biologiškai skaidų polimerą, lydant jį ant struktūrizuotų metalinių kolektorių tam, kad būtų užtikrintos optimalios osteoblastų ląstelių kultūros sąlygos kaulinio audinio regeneracijai. Šiam tikslui pasiekti MES metodu pagaminti bandiniai, laikant adatą su kaitinama vandens cirkuliacijos sistemą vertikaliai (žr. pav. 1.18. A). Tyrimo metu taikyti parametrai pateikti 1.3 lentelėje. Konstruktai buvo surenkami ant kupolo formos vielos tinklo kolektorių pritvirtintų ant įžemintos judančios plokštės.

Lentelė 1.3. Elektroverpimo sąlygos [98]

Parametras	Vertė
Temperatūra	80 °C
Įtampa	20 kV
Atstumas tarp kolektoriaus ir adatos	50 mm
Srauto greitis	10 $\mu\text{L/h}$
Trukmė	20 min

Eksperimentu gauti konstruktai, kurių vidutinis skersmuo 6 mm ir vidutinis storis 3 mm (žr. 1.18 pav. D). Vidutinis porų dydis įgaubtoje konstrukto pusėje svyravo nuo 250 iki 300 μm ir atitiko kolektoriaus tinklo architektūrą. Vidutinis išgaubtos, viršutinės pusės porų dydis buvo mažesnis ir svyravo tarp 20 ir 80 μm . Toliau taikant statinį viršutinio sėjimo metodą, ant viršutinės konstrukto pusės buvo užsėti osteoblastai. Biologinis suderinamumas, ląstelių infiltracija ir osteoblastų augimas PCL konstruktuose buvo tiriamas naudojant konfokalinę lazerinę mikroskopiją ir SEM. Maždaug trečdalis pasėtų ląstelių po 1 dienos prisitvirtino, o per visą 40 dienų kultivavimo laikotarpį, osteoblastų ant mėginių ženkliai padaugėjo, kurie pasižymėjo išgyvenamumu.



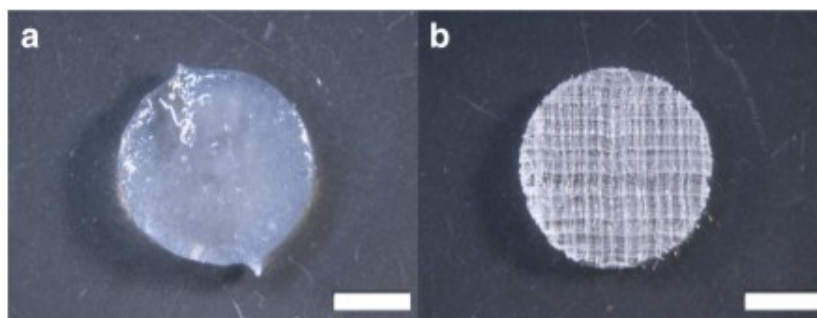
1.18 pav. Tyrimo rezultatai. A – MES įranga; B, C – konstruktai ant vielos tinklo kolektorių; D – kupolo formos konstruktas; E – įgaubtos pluošto pusės SEM vaizdas; F – 250 μm porų dydis mėginiuose [98]

Visser'as ir kiti [99] sustiprino minkštus hidrogelius su poringais PCL mikropluošto tinklais, spausdinamais MES metodu. MES nustatymui taikyti parametrai pateikti 1.4 lentelėje. 2 ml polipropileno švirkšte PCL buvo pašildytas iki 103 °C ir siurblio pagalba ekstruduotas stabilia srove ant kolektoriaus. Gauti konstruktai, kurių matmenys iki 120 x 120 x 1 mm. Siekiant padidinti gautų konstrukto hidrofiliškumą jie buvo apdoroti 70 % etanoliu ir vėliau laikyti 5 M NaOH tirpale 0, 1, 2, 4, 8 ir 16 valandų. Po to, pastoliai buvo plauti dejonizuotame vandenyje, kol pH pasiekė 7,4 ir išdžiovinti. Konstrukto kokybė buvo įvertinta naudojant stereomikroskopiją ir SEM.

Lentelė 1.4. Elektroverpimo sąlygos [99]

Parametras	Vertė
Temperatūra	103 °C
Įtampa	8 – 10 kV
Atstumas tarp kolektoriaus ir adatos	30 mm
Srauto greitis	18 μL/h
Kolektoriaus judėjimo greitis	1400 m/min

Siekiant pagaminti gelio / konstrukto kompozitus, iš želatinos ir metakrilato anhidrido pagaminta GelMA ištirpinta 10 % PBS, turinčioje 12,5 mM APS, 60 °C temperatūroje. Pridėtas TEMED (12,5 mM) ir mišinys suvorteksuotas, gaunant kryžminį GelMA. Konstruktai buvo patalpinti į formą, jų paviršius užlietas GelMA tirpalu ir palikti stingti 1 valandą 37 °C temperatūroje. Gautos 2 mm aukščio konstrukcijos pateiktos 1.19 paveiksle. Į pagamintus kompozitus įterpti žmogaus chondrocitai, vienodai pasiskirstė po PCL konstrukciją. Ląstelės išlaikė sferinę morfologiją ir parodė gyvybingumą. Taip pat, tyrimu įrodyta, kad gelio / konstrukto kompozitų standumas padidėja iki 54 kartų, palyginus su naudojamais tik hidrogeliais ar mikropluoštais.



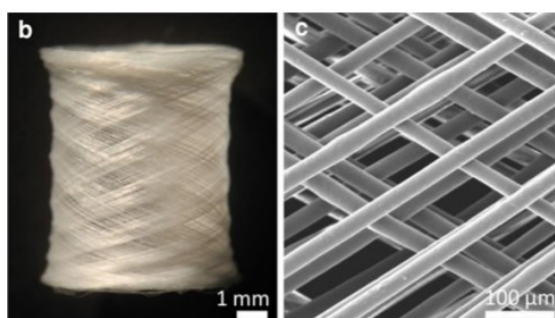
1.19 pav. stereomikroskopijos vaizdai. a – GelMA gelis; b – GelMA gelis, sustiprintas PCL mikropluoštu [99]

Brown'as ir kt. [100] pagamino lanksčias vamzdzines struktūras iš PCL naudojant lydalo elektroverpimo metodą ant besisukančio cilindro ir parodė ląstelių gyvybingumą ir išsiskverbimą į juos. PCL granulės buvo patalpintos į plastikinį 3 ml švirkštą, kuris kaitintas cirkuliuojančiu vandeniu. Polimerų lydalo tiekimo greitis švirkšte buvo kontroliuojamas naudojant programuojamą švirkšto siurbį. Visi proceso parametrai pateikti 1.5 lentelėje. Konstruktai tiesiogiai formuoti ant 6 mm skersmens įžeminto žalvarinio vamzdinio kolektoriaus, sujungto su žingsniniu varikliu. Kiekvienu atveju įranga buvo užprogramuota versti kolektorių pirmyn ir atgal 700 kartų, kad būtų sukurta 700 pluošto sluoksnių. Bandiniai atlikti taikant skirtingą, verpimo kampą, atitinkamai 30 °, 45 ° ir 60 °.

Lentelė 1.5. Elektroverpimo sąlygos [100]

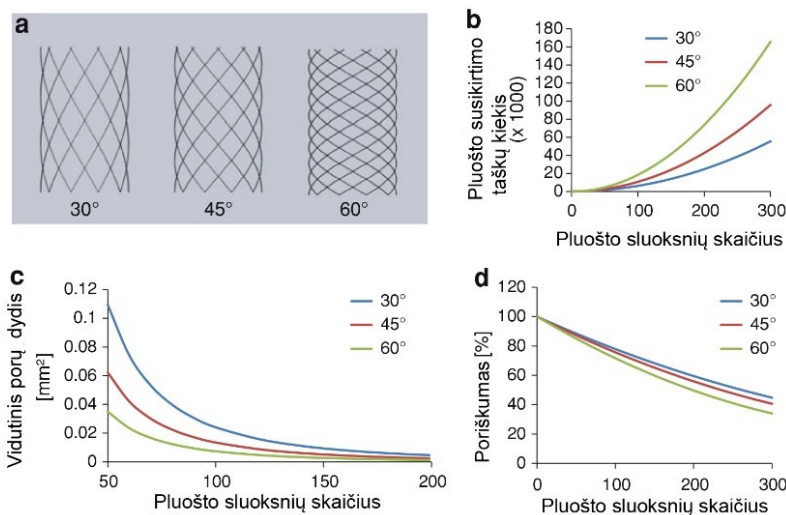
Parametras	Vertė
Temperatūra	78 °C
Įtampa	12 kV
Atstumas tarp kolektoriaus ir adatos	40 mm
Srauto greitis	50 μL/h

Morfologiniam stebėjimui taikyta SEM, vaizdai pateikti 1.20 paveiksle. Atsižvelgiant į viso poringumo kitimą (žr. 1.21 pav.), nustatyta, kad didėjant vyniojimo kampui pastebimas sumažėjęs vidutinis porų dydis. Pluoštuose su 30 ° vyniojimo kampui aptiktas didžiausias poringumas. Tačiau, mažesnis vyniojimo kampas suteikė geresnį mechaninį atsaką į įtempimą ir suspaudimą kitų eksperimentų metu.



1.20 pav. 60 ° vyniojimo kampui suverptas konstruktas. a – vamzdinis konstruktas, c – konstrukto SEM vaizdas [100]

Taip pat šiame tyrime buvo panaudoti pirminiai žmogaus osteoblastai, mezotelio ląstelės ir pelių osteoblastai, siekiant parodyti, kad vamzdžius sudarantys elektrinio sukimo pluoštai nėra citotoksiški ir palaiko ląstelių kolonizaciją. Norint sustiprinti osteoindukciją, PCL vamzdiniai konstruktai buvo padengti kalcio fosfato sluoksniu. Dengimo procesą sudarė trys etapai: paviršiaus aktyvinimas šarminiu apdorojimu (NaOH), vilgymas imituojamu kūno skysčiu (SBF109) ir kalcio fosfato nusodinimas ant mėginių. Ląstelės buvo sėkmingai auginamos ant konstrukto 28 dienas. Osteoblastų atveju ant vamzdelių paviršiaus ir skersai esančių ląstelių susidarė mineralizuota matrica.



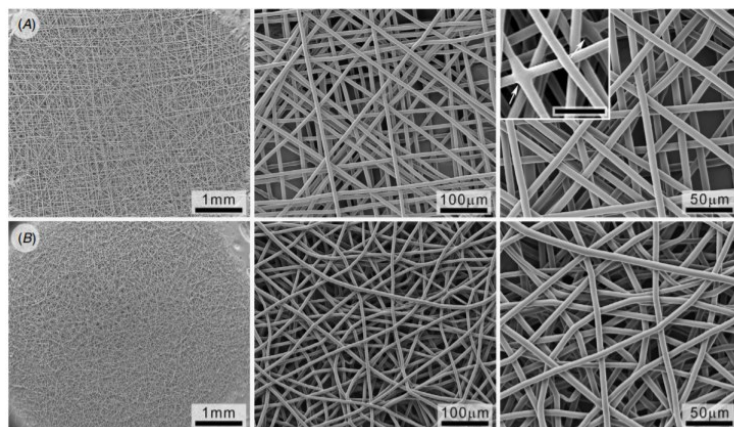
1.21 pav. Mėginių su skirtingu vyniojimo kampu palyginimas [100]

Australijos mokslininkų komanda [101] panaudojo lydalo elektroverpimą gaminant PCL konstruktus odos regeneracijai. Lydalo elektroverpimo pluoštai buvo pagaminti remiantis 1.6 lentelėje pateiktais parametrais. 2 ml švirškštas su PCL granulėmis šildomas iki 78 °C vandens cirkuliacijos sistema. Pluoštų suformuoti PCL ant įžemintos plokštės.

Lentelė 1.6. Elektroverpimo sąlygos [101]

Parametras	Vertė
Temperatūra	78 °C
Įtampa	10 kV
Atstumas tarp kolektoriaus ir adatos	30 mm
Srauto greitis	10 μL/h

Gautų konstrukto morfologija buvo išanalizuota naudojant šviesos mikroskopijos ir optinio mikroskopo vaizdus. Pluošto gijų skersmens ir porų dydžių pasiskirstymas gautuose konstruktuose pavaizduotas 1.22 paveiksle. Statiniu ir tiesioginiu rašymu gautų pluoštų gijų skersmuo buvo panašus (statinio metodo atveju – $6,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$, tiesioginio – $7,5 \pm 1,6 \mu\text{m}$). Ant statinių kolektorių paruoštų pluoštų poros gautos $16 \pm 6 \mu\text{m}$ dydžio, o tiesioginio rašymo atveju – $46 \pm 22 \mu\text{m}$. Tyrimu nustatyta, kad esant vidutiniam $7,5 \mu\text{m}$ pluošto gijų skersmeniui ir vidutiniam $46 \mu\text{m}$ porų dydžiui, pluošto poringumas 87 %. Taip pat ant mėginių buvo užsėti odos fibroblastai ir inkubuoti, o ląstelių infiltracija ir ECM gamyba buvo įvertinta atliekant imunofluorescencinę, elektroninę mikroskopiją, histologinę ir imunohistocheminį vertinimą. Rezultatai parodė teigiamą ląstelių augimą.



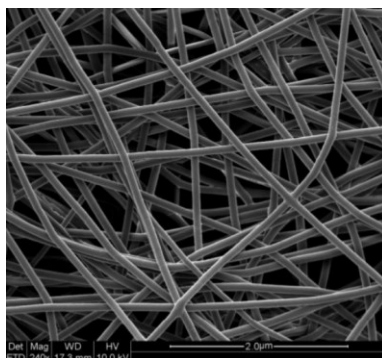
1.22 pav. gautų konstrukčių SEM nuotraukos (A – tiesioginio rašymo, B – statinėmis sąlygomis) [101]

Doustgani's ir kt. [102] ištyrė keturių faktorių: temperatūros, elektrinio lauko stiprio, srauto greičio ir polimero molekulinės masės poveikį pluošto gijų skersmeniui bei porų dydžiui. Pluoštų gamybai iš PLA buvo naudojamas lydalo elektroverpimas. Skirtingos eksperimento proceso sąlygos pateiktos 1.7 lentelėje. Gautų konstrukčių morfologijos analizei buvo taikoma skenuojančioji elektroninė mikroskopija (žr. 1.23 pav.).

Lentelė 1.7. Lydalo elektroverpimo sąlygos [102]

Nr.	Temperatūra, °C	El. lauko stiprumas, kV/cm	Srauto greitis, μL/min	Molekulinė masė, kD	Vid. Pluošto gijų skersmuo, nm
1.	195	3	20	75	350
2.	175	4	60	75	340
3.	175	2	20	30	100
4.	185	3	60	30	90
5.	195	4	40	30	160
6.	175	3	40	60	290
7.	185	4	20	60	270
8.	185	2	40	75	400
9.	195	2	60	60	250

Tyrimo rezultatai parodė, kad polimero molekulinė masė yra reikšmingiausias kontrolės faktorius, turintis įtakos gijų skersmeniui. Kaip matyti iš lentelės, gijų skersmuo didėjo didėjant PLA molekulinei masei, o tai gali būti siejama su lydalo klampa. Pluošto gijų skersmuo sumažėjo didėjant elektrinio lauko stiprumui, o didinant srauto greitį – padidėjo. Galiausiai tyrimu nustatyta, kad optimalūs PLA pluoštų, kurių gijų skersmuo mažiausias, parametrai yra 175 °C temperatūra, 4 kV/cm elektrinio lauko stiprumas, 40 ml/min srauto greitis ir 30 kDa molekulinė masė. Šie pluoštai gali būti geri kandidatai biomedicinos srityje, nes gautas itin didelis paviršiaus ir tūrio santykis.



1.23 pav. PLA pluoštų SEM vaizdas [102]

Kinijos mokslininkai [103] įvertino temperatūros įtaką pluošto gijų skersmeniui. PLA konstruktai buvo pagaminti naudojant lydalo elektroverpimo įrangą. Proceso parametrai pateikti 1.8 lentelėje. Pluoštų morfologija buvo įvertinta analizuojant SEM vaizdus. Nustatyta, kad didėjant temperatūrai konstrukto gijų skersmuo mažėjo. PLA konstrukto apskaičiuotas vidutinis pluošto gijų skersmuo svyravo nuo 58,46 iki 14,50 μm . Kai lydalo temperatūra viršijo 250 $^{\circ}\text{C}$ konstruktuose susidarė granulės. Tokiam pokyčiui įvertinti buvo naudojama FTIR analizė. Įrodė, kad pakilus temperatūrai polimeras skilo ir molekulinės grandinės nutrūko.

Lentelė 1.8. Lydalo elektroverpimo sąlygos [103]

Parametras	Vertė
Temperatūra	200 – 260 $^{\circ}\text{C}$
Įtampa	16 – 24 kV
Atstumas tarp kolektoriaus ir adatos	5 – 90 mm

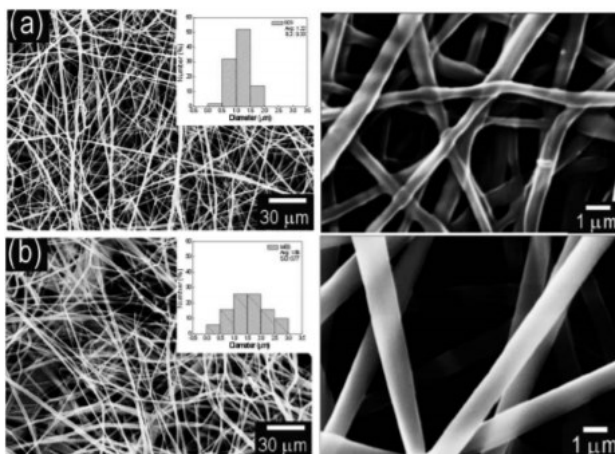
Pietų Korėjos mokslininkai [104] ištyrė du metodus – tirpalo ir lydalo elektroverpimo, siekiant išnagrinėti tirpiklių poveikį ląstelių veiklai ant pastolių. PLA konstruktai buvo pagaminti naudojant du skirtingus elektroverpimo metodus, kurių sąlygos pateiktos 1.9 lentelėje. Tirpalo elektroverpimo procesui PLA ištirpintas chloroformo, acetono mišinyje. 8 % PLA tirpalas buvo paruoštas maišant kratytuvu vieną dieną.

Lentelė 1.9. (A) tirpalo ir (B) lydalo elektroverpimo sąlygos [104]

Parametras	A Vertė	B Vertė
Temperatūra	-	220 – 230 $^{\circ}\text{C}$
Įtampa	15 kV	29 kV
Atstumas tarp kolektoriaus ir adatos	150 mm	120 mm
Srauto greitis	1,2 mL/h	0,3 ml/h

Gautų konstrukto vaizdai pateikti 1.24 paveiksle. Išanalizavus SEM vaizdus nustatyta, kad vidutiniai pluoštų gijų skersmenys tirpalo ir lydalo elektroverpimu gauti atitinkamai $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ir $1,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$. Nors pluoštų skersmenys gauti nevienodi, manoma, kad toks skirtumas ląstelių veiklai gali būti nereikšmingas. Pluoštų, gautų tirpalo elektroverpimu (porų dydžio diapazonas 0,9 – 5 μm) gautas

siauresnis porų dydžio pasiskirstymas ir mažesni porų skersmenys nei MES konstruktuose (porų diapazonas 1,1 – 8,0 μm). Be to, gautų konstrukčių poringumas gautas atitinkamai $60,7 \pm 6 \%$ ir $60,3 \pm 8 \%$. Remiantis rezultatais, nors abejais procesais gauta skirtinga konstrukčių porų struktūra, porų savybės yra panašios.



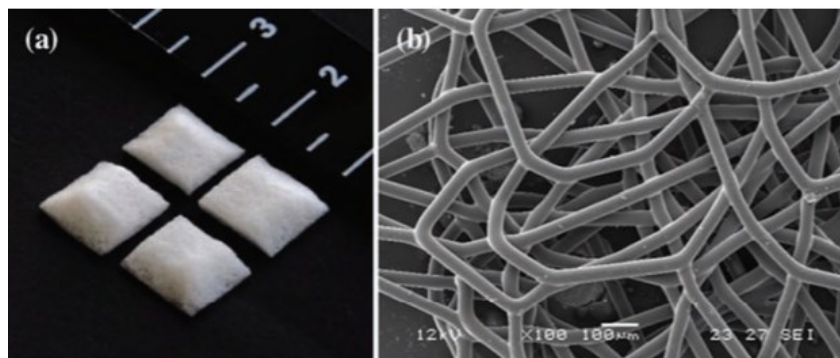
1.24 pav. SEM nuotraukos. a – Tirpalo elektroverpimu gauti pluoštai, b – MES pluoštai [104]

Gazzarri's Ir kt. [10] biologiškai išanalizavo PCL konstrukčių gebėjimą palaikyti odos audinių regeneraciją. PCL konstruktai suformuoti naudojant lydalo elektroverpimo pagrindu pagamintą sistemą, leidžiančią sluoksnuotu būdu pagaminti trimates struktūras. Polimeras patalpintas į talpyklę ir 1 valandą laikytas 160 °C temperatūroje tam, kad pilnai išsilydytų. Bandinių gamybos metu aplinkos temperatūra ir drėgmė verpimo kameroje buvo palaikoma atitinkamai $35 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ ir $22 \% \pm 4 \%$. Taikant parametrus pateiktus 1.10 lentelėje gautos $40 \pm 5 \text{ μm}$ gijų skersmens trimatės konstrukcijos sudarytos iš penkių mikropluošto sluoksnių (žr. 1.25 pav.).

Lentelė 1.10. Lydalo elektroverpimo sąlygos [10]

Parametras	Vertė
Temperatūra	160 °C
Įtampa	25 kV
Atstumas tarp kolektoriaus ir adatos	10 cm
Srauto greitis	3,7 ml/h

Gauti konstruktai buvo biologiškai ištirti dėl jų gebėjimo palaikyti odos audinių regeneraciją. Šiam tikslui pelių embriono fibroblastų ir žmogaus keratinocitų ląstelių linijos buvo sėjamos ant polimerinių karkasų. Ląstelių gyvybingumas, proliferacija ir kolageno gamyba buvo įvertinta WST-1 tyrimu ir Direct Red80 dažais. Ląstelių morfologija ir atramų kolonizacija įvertinta skenuojančia elektronine mikroskopija ir konfokaline lazerine skenuojančia mikroskopija. Gauti rezultatai parodė pastolių gebėjimą palaikyti ląstelių sukibimą, dauginimąsi ir migraciją, taip padidinant ląstelių gebėjimą gaminti kolageną. Be to, pastoliai parodė savo sugebėjimą palaikyti abiejų ląstelių linijų augimą.



1.25 pav. a – PCL pluoštai, b – SEM pluošto vaizdas [10]

1.5. Darbo aktualumo pagrindimas

Regeneracinė medicina kartu su audinių inžinerija nuolat tobulėja ir ieško efektyvesnių metodų, kurie būtų kuo universaliau pritaikomi visiems pacientams. Lydalo elektroverpimas yra žalias metodas, pasižymintis paprastumu, ekonomišku, o keičiant proceso parametrus galima nesunkiai išgauti norimą rezultatą. Todėl tai yra puikus kandidatas biomedicinoje.

2010 metų gegužės mėnesį atliktas literatūros tyrimas (ISI Web of Science) apskaičiavo, kad iš 3480 žurnalų straipsnių, kuriuose yra žodžiai „elektroverpimas“ tik 24 straipsniuose minimas lydalo elektroverpimo naudojimas [95]. Šiandien, literatūros susijusios su lydalo elektroverpimo metodu yra daugiau, tačiau informacija yra nepakankama pritaikymui biomedicinoje. Šiuo metodu tirtų žaliavų skaičius yra ribotas. Pastaraisiais metais vis daugiau populiarumo sulaukia tvarūs, iš atsinaujinančių išteklių gaminami, bioskaidūs polimerai, tarp jų – polilaktidas. Šis polimeras savo savybėmis yra patrauklus naudoti medicinoje, tačiau jo pritaikomumas lydalo elektroverpimui yra mažai ištirtas. Norint pritaikyti konstruktus regeneracinei medicinai jie turi būti sukonstruoti taip, kad atitiktų regeneruojamo audinio kriterijus. Norint pritaikyti lydalo elektroverpimo techniką regeneracinėje medicinoje reikia geriau suprasti lydalo elektroverpimą ir polimerinių konstrukčių gamybą, todėl būtina ištirti reguliuojančių parametrų poveikį karkasams [105].

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Tyrimo atlikimo vieta: tiriamasis darbas atliktas KTU, cheminės technologijos fakulteto, aplinkosaugos technologijos katedros mokslo padalinyje, 2020 – 2022 metais.

Tyrimo objektas: polipieno rūgštis, kurios tinkamumas audinių regeneracijai įvertintas taikant lydalo elektroverpimo technologiją.

Sąlygos: viso tyrimo metu buvo palaikomos sterilios sąlygos ir laikomasi saugaus darbo taisyklių, darbo metu dėvėtos pirštinės ir baltas švarus chalatas. Prieš pradėdant darbus ir juos baigus dezinfekuota darbo vieta ir rankos dezinfekciniu tirpalu, 70 % etilo alkoholiu.

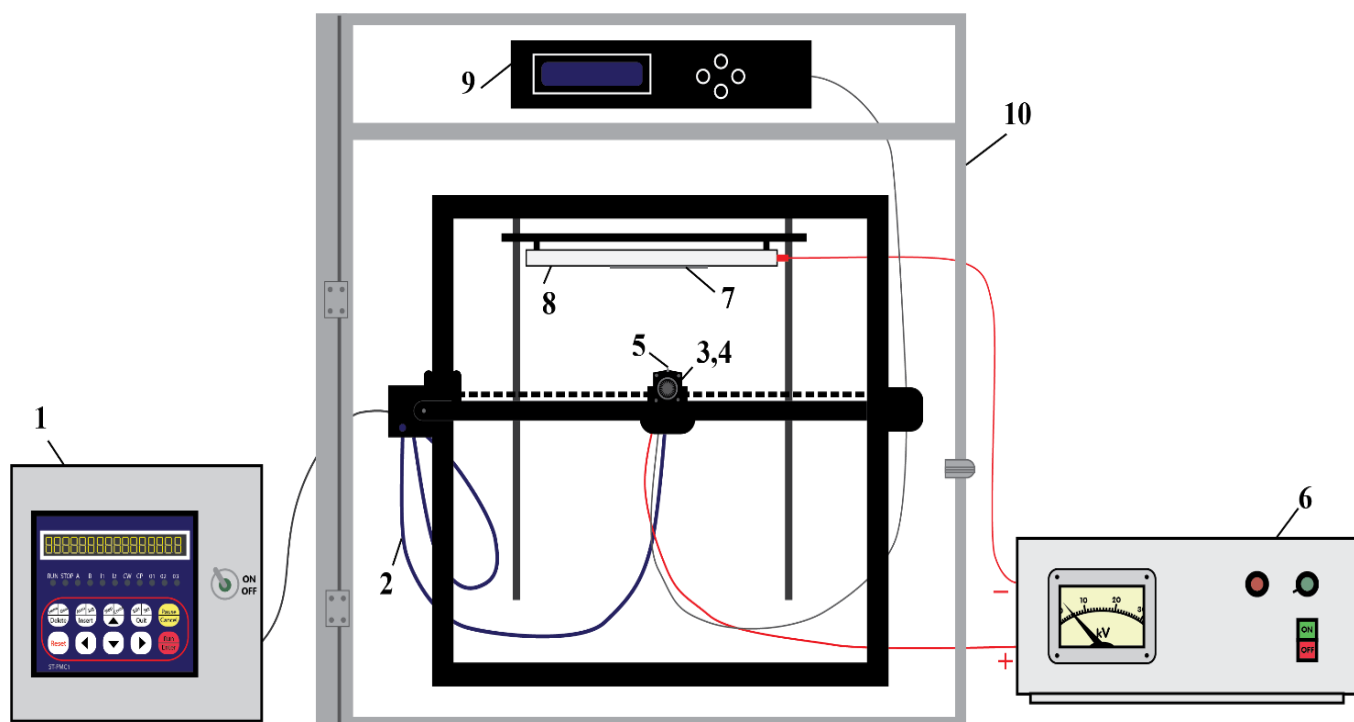
Tyrimo metu naudotos medžiagos: lentelėje 2.1 pateikiama informacija apie viso tyrimo metu naudotas medžiagas. Pagrindinė žaliava – polipieno rūgštis, kurios molekulinė masė 60 000 g/mol.

2.1 lentelė. Eksperimentams naudotų medžiagų charakteristikos

Pavadinimas	Molekulinė formulė	CAS no.	Gamintojas
Polipieno rūgštis (PLA)	$(C_3H_4O_2)_n$	26100-51-6	Sigma-Aldrich, Vokietija
Parafinas	C_nH_{2n+2}	8002-74-2	-

Tyrimo metu naudota įranga:

- lydalo elektroverpimo įranga (KTU, Cheminės technologijos fakultetas, Lietuva)
- ekstruderis, (KTU, Cheminės technologijos fakultetas, Lietuva)
- vakuuminė džiovyklė, ChemLand FCD-3000
- analitinės svarstyklės, Ohaus Analytica Plus
- skenuojantis elektrinis mikroskopas, SEM S-3400N, Hitachi, Vokietija
- kompiuterinės programos: OriginLab 2019, IBM SPSS Statistics 26, ImageJ, Design Expert 13, OneAttention v1.0
- Furje transformacijos infraraudonosios srities spektrometras: Perkin-Elmer Frontier, Amerika
- mechaninių savybių įvertinimo įranga, BDO-FB 0.5 TH, Zwick GmbH & Co, Vokietija
- vandens vilgymo kampo matavimo įranga, Theta Lite TL 101 optical tensiometer, Biolin Scientific, Suomija



2.1 pav. Lydalo elektroverpimo konstrukcijos schema; schemos dalys: 1 – filamento tiekimo sistema; 2 – polimero filamentas; 3, 4 – šildymo mazgas, ventiliatorius; 5 – adata; 6 – aukštos įtampos maitinimo šaltinis; 7 – aliuminio kolektorius; 8 – judinamoji plokštė; 9 – valdymo blokas; 10 – stiklinė spinta.

Tiriamąjį darbą metu austiniai pluoštai suformuoti taikant lydalo elektroverpimo technologiją, kurios schema pateikta 2.1 paveiksle. Ši įranga buvo suprojektuota ir pagaminta modifikuojant 3D spausdintuvą Kauno technologijos universiteto, cheminės technologijos fakulteto, aplinkosaugos technologijos katedroje. Pagrindiniai komponentai sudarantys lydalo elektroverpimo sąranką yra: žingsninis tiek tuvas (2.1 pav. – 1), kurio pagalba pritvirtintas polimero filamentas (2.1 pav. – 2), kontroliuojamai tiekiamas į šildymo sistemą (2.1 pav. – 3). Čia išlydomas polimero filamento galas jungiamas prie pat įpurškimo adatos (2.1 pav. – 5). Šildymo sistema – tai gaubianti polimerą metalinė mova su viduje esančiais kaitinimo elementais. Ventiliatorius (2.1 pav. – 4) kartu su kaitinimo mazgu sumontuoti ant judančio laikiklio. Ventiliatorius palaiko temperatūrą reikiamose ribose viso proceso metu bei baigus procesą gali staigiai sumažinti temperatūrą. Kaitinimo mazgo stovė vertikaliai įtvirtinta buka, 0,2 mm skersmens plieninė adata, pro kurią purškiamas išlydytas polimeras link kolektoriaus (2.1 pav. – 7). Elektrinį lauką palaikė aukštos įtampos maitinimo šaltinis (2.1 pav. – 6), kuris gali tiekti iki 30 kV įtampą. Teigiamas elektrodas buvo prijungtas prie adatos, kad būtų sukurtas elektrinis laukas tarp jos ir įžeminto kolektoriaus, kuris veikė kaip priešingo poliaus elektrodas. Kaip kolektorius naudota aliuminio plokštė (100 x 100 mm), ant kurios buvo surenkami neaustiniai pluoštai. Tam, kad pluošto surinkimo procesas būtų kontroliuojamas kolektorius buvo prikabinamas prie judamos plokštės (2.1 pav. – 8) sujungtos su specialiu valdikliu (2.1 pav. – 9). Valdymo bloku galima kontroliuoti temperatūrą kaitinimo mazge, keisti adatos z ašies padėtį bei valdyti surinkimo paviršiaus ir adatos judėjimą. Tiesioginis rašymo metodas buvo atliekamas valdant surenkamąją plokštę pagal iš anksto suformuotus kodus, vadinamus G kodais. Siekiant išlaikyti stabilias aplinkos sąlygas, lydalo elektroverpimo sąranka buvo sumontuota uždaroje, stiklinėje spintoje (2.1 pav. – 10), kurioje palaikyta pastovi temperatūra ir drėgmė.

2.1. Polilaktido filamentų formavimas

Ekstruzija – tai ilgų fiksuoto skerspjūvio gaminių gamybos procesas, kurio metu išlydyta žaliava išspaudžiama pro norimą formą. Ši technologija naudojama apdoroti metalus, medieną, keramiką ir plastikus. Ekstruderį sudaro šildoma, fiksuota metalinė statinė su sraigtais, kuriais žaliava pernešama iš įkaitintos statinės padavimo galo į priekį link štampos [106]. Per štampos išeinantis produktas aušinamas (pučiamu oru arba vandens vonioje), kad sutvirtėtų ir įgautų naują formą. Pagrindinis šio proceso pranašumai, palyginti su kitais formavimo procesais, yra galimybė apdirbti trapias medžiagas, nes medžiaga susiduria tik su gniuždymo ir šlyties įtempimais [107].

Šiame tyrime naudoti filamentai buvo pagaminti naudojant PLA (MW) 60 000 g/mol (Sigma Aldrich, Vokietija). Pirmiausia, stiklinėje buvo sumaišytos PLA granulės (50 g) su 1 ml skystu parafinu. Masė maišyta tol, kol granulės tolygiai pasidengė parafino sluoksniu. Filamentai buvo suformuoti naudojant stalinį mikroekstruderį, esant 180 °C temperatūrai. Paruošta masė pakrauta į ekstruderio statinę, kurioje kaitinimo elementai suminkštino ir išlydė polimerą. Tiekimo sraigtų pagalba, nenutrūkstamai išspausa gija pro 2 mm skersmens formą. Procesas vykdytas tol, kol baigėsi neapdorotos granulės. Gautas ištisinis polimerinis profilis, kuris kietėja aušinant. Suformuotiems filamentams buvo leista galutinai atvėsti ir sukietėti. Galiausiai filamentai susukti ir patalpinti į vakuuminę džiovyklą (40°C, 0,08 MPa), kurioje laikomi prieš kiekvieną eksperimentą 12 valandų.

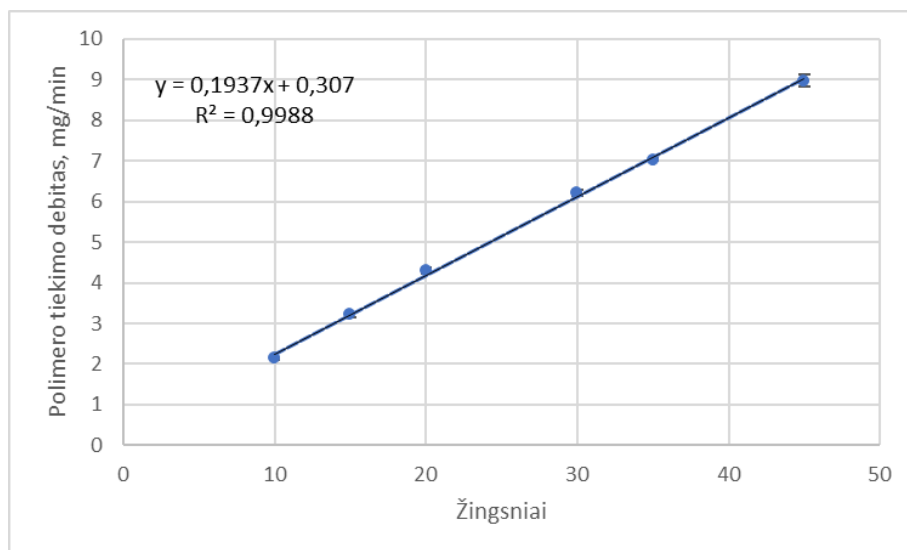
2.2. Žingsninio tiektuvo debito matavimas

2.2 lentelė. Debito matavimų rezultatai

Laikas, min	Filamento tiekimo debitas, žingsniais	Vidutinė sudozuota filamento masė, mg
5	10	10,7
5	15	16,1
5	20	21,5
5	30	31,0
5	35	35,2
5	45	44,9

Tyrimo metu naudota lydalo elektroverpimo sistemą sudaro filamento tiektuvas, kurio srauto greitis matuojamas žingsninėmis vertėmis. Srautas yra filamento kiekis, kuris tiekiamas pro adatą, kad būtų suformuotas pluoštas. Siekiant optimizuoti proceso parametrus, polimero tiekimo debitas buvo išreikštas miligramais per minutę. Debitui apskaičiuoti pasirinktos pagrindinės tiektuvo žingsninės vertės – 10, 15, 20, 30, 35, 45. Įjungus žingsninį tiektuvą ir parinkus atitinkamą vertę, paleistas srauto tekėjimas adatos link. Šiuo atveju neįjungus įtampos buvo fiksuojamas išeinantis filamentas. Užtikrinant rezultatų tikslumą, visi matavimai fiksuoti praėjus lygiai 5 minutėms. Po 5 minučių, pro adatą praėjęs filamento kiekis nukerpamas ir pasveriamas. Visa tai kartota su kiekviena tiektuvo verte tris kartus. Gauti rezultatai pateikti 2.2 lentelėje.

Iš gautų duomenų apskaičiuotas polimero tiekimo greitis per minutę ir nubrėžta polimero tiekimo debito priklausomybė nuo žingsnių. Pagal 2.2 pav. pateiktą lygtį išskaičiuotos visos tyrimo metu naudotos žingsninės vertės, kurios toliau bus pateikiamos mg/min duomenų lentelėse.



2.2 pav. Polimero tiekimo debito priklausomybė nuo žingsnių

2.3. Pirminis proceso optimizavimo eksperimentas

Pirmuoju eksperimentu buvo siekiama surinkti kuo daugiau informacijos apie lydalo elektroverpimo proceso sąlygų įtaką PLA konstruktais ir nustatyti gamybos technologijos ribas užtikrinančias efektyvų procesą. Tikslui pasiekti buvo atlikta literatūros analizė ir atitinkamai pasirinktos įvairios lydalo elektroverpimo sąlygos. Parametrai, kurie buvo keičiami: šildymo mazgo temperatūra, atstumas tarp adatos ir kolektoriaus, įtampa bei polimero tiekimo debitas. Eksperimente naudoti lydalo elektroverpimo proceso parametrai pateikti 2.3 lentelėje.

Ekstruderiu suformuoti PLA filamentai buvo naudojami formuojant pluoštus lydalo elektroverpimo procese. Prieš atliekant eksperimentą, PLA filamentai 12 valandų džiovinti vakuuminėje džiovykloje (40°C, 0,08 MPa). Polimero filamentas buvo įdėtas į tiekimo sistemą ir prijungtas prie kaitinimo sistemos. PLA buvo šildomas 210 – 240 °C ± 1,0 °C temperatūroje kaitinimo mazge su pritvirtinta adata. Srauto reguliatorius tiekė PLA per antgalį 3,21 – 9,02 mg/min ribose. 0,3 mm skersmens adata kartu su kaitinimo sistema buvo prijungta prie maitinimo šaltinio ir nukreipta į viršų, link įžeminto kolektoriaus. Aukšta įtampa buvo kontroliuojama 5 – 20 kV ribose. Visų eksperimentų metu, prieš pluošto surinkimą, lydalo elektros verpimo srovei buvo leista stabilizuotis 5 minutes ir pašalintas susikaupęs pluoštas ant kolektoriaus. Įkrauta lydalo srovė buvo verpiama ant įžemintos aliuminio plokštelės 5 – 40 mm atstumu. Vieno mėginio formavimo trukmė 10 – 15 minučių. Suformuoti 3 x 3 cm matmenų atsitiktinai orientuoti nanopluoštai neaustinio audinio pavidalu. Iš viso suformuota 19 skirtingų mėginių, kuriems iš eilės suteikti numeriai LK1 – LK20. Elektroverpimo procesas buvo atliktas stiklinėje spintoje, kurioje buvo palaikoma stabili 24,6 °C ± 0,5 °C aplinkos temperatūra ir 45,1 ± 0,7 % santykis oro drėgmės (RH, %) lygis.

2.3 lentelė. Eksperimentinių konstrukčių formavimo sąlygos

Mėginio kodas	Įtampa, kV	Polimero tiekimo debitas, mg/min	Atstumas tarp adatos ir kolektoriaus, mm	Temperatūra, °C
LK18	5	4,18	5	220
LK19	5	6,12	5	220
LK20	5	6,12	5	230
LK14	10	3,21	10	220
LK15	10	5,15	10	220
LK16	10	9,01	10	210
LK9	14	3,21	20	210
LK10	14	4,18	20	210
LK11	20	4,18	20	210
LK12	20	4,18	20	220
LK13	20	4,18	20	230
LK1	17	5,15	20	210
LK2	17	7,09	20	210
LK4	20	7,09	20	235
LK3	17	7,09	20	240
LK7	14	9,02	20	210
LK8	20	9,02	20	210
LK6	14	9,02	20	235
LK5	17	9,02	20	235

2.4. PLA konstrukčių formavimas lydalo elektrovedimo metodu

Antruoju eksperimentu buvo siekiama išgauti pluoštines struktūras ir įvertinti proceso parametrų įtaką konstrukto gijų morfologijai. Polimeriniai konstruktai buvo suverpti naudojant PLA (MW) 60 000 g/mol (Sigma Aldrich, Vokietija), ant elektra laidžių kolektorių, kaip aprašyta ankstesniame 2.3 skyriuje. Atsižvelgiant į pirminio eksperimento rezultatus, antrojo eksperimento kintamųjų vertės pasirinktos atitinkamai: atstumas tarp adatos ir kolektoriaus (5, 10, 15, 20 mm), lydymosi temperatūra (210, 220, 230 ± 1,0 °C), įtampa (5, 10, 15, 20 kV) ir srauto greitis (4,18, 6,12, 8,06 mg/min). Parametrai, kurie buvo išlaikyti pastovūs viso proceso metu – adatos skersmuo (0,3 mm), kolektoriaus judėjimo režimas, greitis. Elektrovedimo procesas buvo atliktas stiklinėje spintoje, kurioje buvo palaikoma stabili 24,6 °C ± 0,5 °C aplinkos temperatūra ir 45,1 ± 0,7 % santykis oro drėgmės (RH, %) lygis. Iš viso suformuoti 48 austiniai pluoštai, kuriems eilės tvarka suteikti kodai LK22 – LK45. Suverpta 12 skirtingų mėginių 3 x 3 cm matmenimis, kurių formavimo trukmė 10 – 15 minučių. Suformuoti mėginiai sukarpyti 8 x 8 mm kvadrateliais, kurie bus naudojami sekančiuose tyrimuose. Taip pat suformuota 12 skirtingomis sąlygomis mėginių po tris vienetus, kurie skirti mechaninių

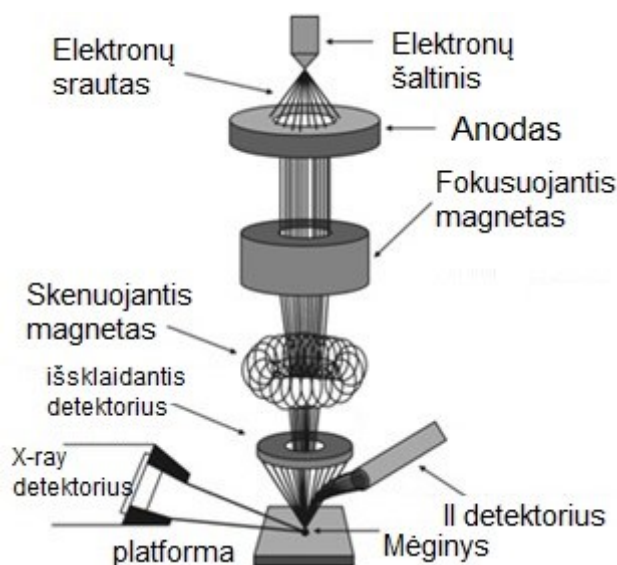
savybių įvertinimo tempiant tyrimui. Šių mėginių formavimo trukmė 20 minučių, 1 x 7 cm matmenimis.

2.4 lentelė. Eksperimentinių pluoštų formavimo sąlygos

Mėginio kodas	Įtampa, kV	Debitas, mg/min	Atstumas tarp adatos ir kolektoriaus, mm	Temperatūra, °C
LK33	5	4,18	5	210
LK32	5	6,12	5	220
LK31	5	8,06	5	230
LK28	10	4,18	10	210
LK29	10	6,12	10	220
LK30	10	8,06	10	230
LK27	15	4,18	15	210
LK26	15	6,12	15	220
LK25	15	8,06	15	230
LK22	20	4,18	20	210
LK23	20	6,12	20	220
LK24	20	8,06	20	230

2.5. Skenuojančios mikroskopijos analizė

Skenuojantis elektroninis mikroskopas – tai mikroskopas, skirtas daug kartų padidintam kietų objektų paviršiaus morfologiniams ir struktūriniams tyrimams. Šiuo metodu galima nustatyti bandinio cheminę sudėtį bei kristalografinę orientaciją. Pagrindiniai įrangos komponentai yra pavaizduoti 2.3 paveiksle, kurie atitinkamai – elektronų šaltinis, anodas, elektromagnetiniai lęšiai, nuskaitymo ritė, detektorius, vakuuminė sistema [108].



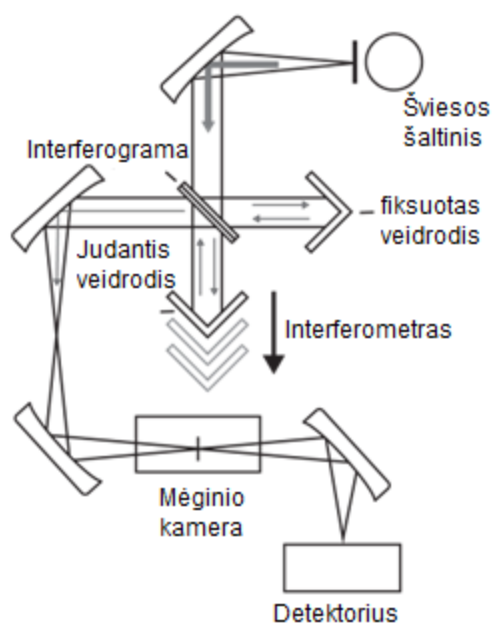
2.3 pav. Skenuojantis elektroninis mikroskopas [109]

Elektroniniai mikroskopai veikia nuskaitant mėginį elektronų pluoštais, kurie atsispindi arba išmuša iš arti paviršiaus esančios mėginio srities. Pirmiausia, elektronų šaltinis, esantis kolonėlės viršuje, išsiskiria elektronų srautą, kurį pagreitina ir pritraukia teigiamai įkrautas anodas, o elektromagnetiniai lęšiai sufokusuoja elektronų srautą [110]. Elektronų spindulys sufokusuojamas į bandinio paviršių. Elektronų pluoštai nuskaito mėginį rastriniu būdu, skenuodami paviršiaus plotą linijomis iš vienos pusės į kitą, iš viršaus į apačią. Elektronai sąveikauja su mėginio paviršiuje esančiais atomais. Ši sąveika skatina didelės energijos atgalinės sklaidos elektronų ir mažos energijos antrinių elektronų emisiją nuo bandinio paviršiaus. Elektronai, kurie atsispindi nuo bandinio paviršiaus, surenkami ir padauginami. Mikroskopo detektoriai paima šiuos signalus ir sukuria didelės raiškos vaizdus, matomus kompiuterio ekrane. Tai įvyksta vakuomo sąlygomis, kurios neleidžia mikroskopo kolonėlėje esančioms molekulėms arba atomams sąveikauti su elektronų pluoštu. Todėl vakuumas apsaugo elektronų šaltinį nuo vibracijų, triukšmo ir užtikrina aukštą vaizdo kokybę [111].

Siekiant įvertinti MES proceso tikslumą, PLA konstruktų paviršiaus morfologija buvo ištirta naudojant skenuojantį elektroninį mikroskopą (SEM S-3400N, Hitachi Germany). Lydalo elektroverpimo būdu ankščiau gauti 8 x 8 mm matmenų neaustiniai pluoštai buvo naudojami tyrimui atlikti. Bandiniai buvo pritvirtinti prie stovo SEM vakuuminėje kameroje ir esant 3 kV įtampai buvo sugeneruoti vaizdai. Skaidulų analizė buvo atlikta naudojant vaizdo apdorojimo „ImageJ“ programinę įrangą. Pluošto skersmens pasiskirstymas ir vidurkis buvo įvertintas analizuojant 50 matavimų iš SEM mikrografijų.

2.6. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos analizė

Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija (FTIR, angl. *Fourier transform infrared spectroscopy*) matuojamas bangų ilgių diapazonas infraraudonųjų spindulių srityje, kuri sugeria medžiaga. FTIR analizė gali būti naudojama norint nustatyti nežinomas medžiagas, priedus, medžiagos paviršiaus užterštumą, nes iš rezultatų galima tiksliai matyti mėginio molekulinę sudėtį ir struktūrą [5].

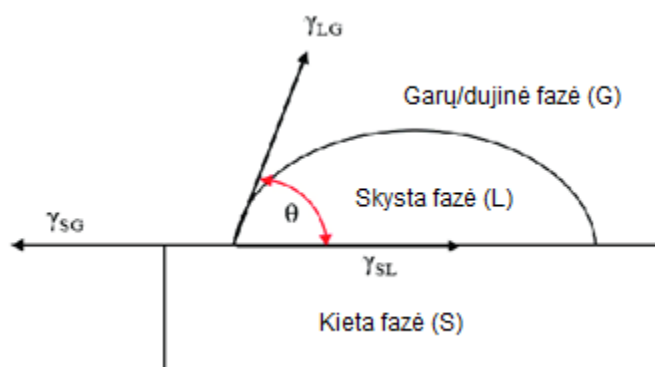


2.4 pav. FTIR spektrometro schema [112]

Mėginiams identifikuoti naudojamas optinis prietaisas – interferometras, kurį sudaro du statmeni vienas kitam veidrodžiai bei spinduliuotės skaitytuvas. Pereidama IR spinduliuotė per interferometrą, patenka į skirstytuvą, kuris atspindi ar praleidžia spinduliuotę, taip padalydamas ją į du statmenus vienas kitam vienodo intensyvumo srautus. Dalis spinduliuotės patenka į nejudantį veidrodį, o kita pusė – į judantį veidrodį. Po interferencijos, suliejant du spindulius, gaunama interferograma, spinduliuotės skaitytuvo nukreipiama į lyginamąjį ir tiriamąjį bandinį. Bandinys sugeria visus jo spektrui būdingus bangos ilgius, o dalį praleidžia [5]. Tada signalas nukreipiamas į detektorių, o rezultatas dekoduojamas kompiuteriu atliekant Furjė transformaciją. Signalas išskaidomas į atskirus absorbuotos spinduliuotės dažnius ir sukuriama unikali intensyvumo priklausomybė nuo dažnio, o gauto grafiko komponentai identifikuojami naudojant virtualias bibliotekas [113].

PLA pluoštų molekulinei sudėčiai ir funkcinėms savybėms įvertinti buvo atlikta Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija. Tam atlikti buvo naudojamos PLA granulės, kaip lyginamasis bandinys bei 8 x 8 mm dydžio lydalo elektroverpimu gauti bandiniai. Bandiniai buvo patalpinti į bandinio laikiklį, FTIR duomenys analizuoti naudojant programinę įrangą, o spektrai užfiksuoti diapazone nuo 4000 iki 650 cm⁻¹.

2.7. Vandens vilgymo kampo nustatymas PLA konstrukto paviršiuje



2.5 pav. Vandens lašo kontaktinis kampas [114]

Šiurkštumas tiesiogiai sąlygoja ląstelių sukibimą, proliferaciją ir gyvybingumą [7], o kontaktinis kampas su vandeniu atspindi medžiagos hidrofiliškumą ir, atitinkamai, ląstelės ir medžiagos sąveiką. Vandens vilgymo kampas θ yra kiekybinis kietosios medžiagos sudrėkinimo skysčiu matas. Jis apibrėžiamas kaip kampas, kurį sudaro skystis ties trijų fazių riba, kur susikerta skystis, dujos ir kietas medžiaga. Šis kampas lemia tiek kietos medžiagos, tiek skysčio savybės, ir skysčio bei kietos medžiagos tarpmolekulinės sąveikos. Vandens sąlyčio kampas matuojamas konstrukto hidrofiliškumui/hidrofobiškumui įvertinti naudojant optinį tenziometrą. Youngo lygtis (žr. 2.6 pav.) apibūdina pusiausvyrą trijų fazių kontakte. Optiniuose tenziometruose skysčio lašo forma analizuojama naudojant skaitmeninę kamerą, kad būtų galima nufotografuoti lašą. Taip išgaunamas kritimo profilis, programinė įranga suderina teorinę Young-Laplace lygtį su eksperimento liestinės linija, nubrėžta nuo kritimo pradinės linijos iki krašto [38]. O pagal pritaikytus parametrus apskaičiuojamas paviršiaus įtempimas.

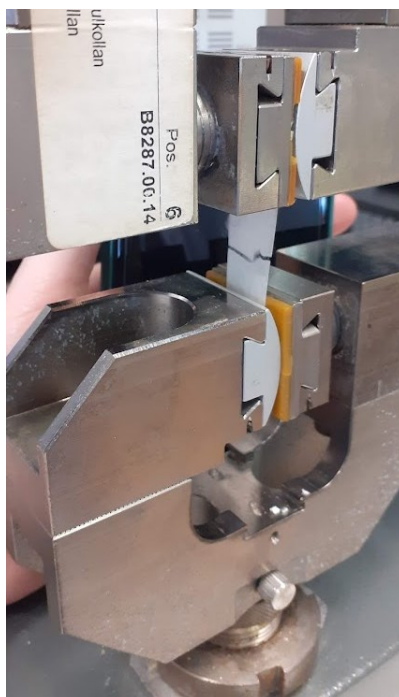
$$\sigma_{SG} = \sigma_{SL} + \sigma_{LG} \cdot \cos\theta$$

2.6 pav. Young-Laplace lygtis [38]

PLA pluoštų hidrofiliškumo įvertinimas atliktas naudojant Theta Lite TL 101 (Biolin Scientific, Suomija) vandens vilgymo kampo analizatorių, tenziometrą, kambario temperatūroje 20 ± 1 °C. Lydalo elektroverpimo būdu ankščiau gauti 8 x 8 mm matmenų neaustiniai pluoštai buvo naudojami tyrimui atlikti. Mėginiai buvo dedami ant mėginio laikiklio ir ant jų rankiniu dozuojamu švirkštu buvo užlašinamas 20 μ L distiliuoto vandens lašelis. Vilgymo kampas buvo išmatuotas pagal vandens lašo vaizdą mėginio paviršiuje, paimtą CCD kamera ir automatiškai apskaičiuotas programine įranga OneAttention v1.0.

2.8. PLA konstrukčių mechaninių savybių analizė

Stiprumas – medžiagos savybė atlaikyti išorinių poveikių atsiradusius įtempimus. Mechaninė konstrukto analizė yra svarbi įvertinant galimą deformaciją, kad būtų užtikrinta, jog struktūra nesutrūks regeneracijos laikotarpiu. Tai gyvybiškai svarbu ląstelėms ir sėkmingai audinių regeneracijai [7]. Medžiagų mechanines savybes galima apibūdinti įvairiomis priemonėmis: pailgėjimo bandymu, suspaudimo bandymu, kietumo bandymu ir lenkimo bandymu [5]. Šiuo atveju pluoštinių kompozitų mėginiams buvo atliktas pailgėjimo testas, kad būtų gauta įtempimų ir deformacijų kreivė.



2.7 pav. mechaninių savybių tyrimo įranga

Ekperimentui atlikti buvo naudoti ankščiau lydalo elektroverpimo būdu paruošti bandiniai, kurių matmenys pateikti 2.5 lentelėje. Įranga naudota eksperimento metu pavaizduota 2.7 paveiksle. Vertikaliai orientuotiems mėginiams buvo atliktas tempimo bandymas naudojant tempimo / gniuždymo bandymo mašiną kambario temperatūroje ($22,4 \pm 1$ °C). Stačiakampės mėginių juostelės buvo pritvirtintos prie spaustuko formos mėginio laikiklių. Tempimo metu įtempimo greitis buvo nustatytas 0,05 mm/min, o mėginys tempiamas tol, kol suyra.

2.5 lentelė. Eksperimentų duomenys

Mėginio kodas	Igis, cm	Plotis, cm	Storis, mm
LK33	7,0	1,00	0,37
LK32	7,0	1,50	0,21
LK31	7,0	1,60	0,27
LK28	7,0	1,50	0,15
LK29	7,0	1,50	0,12
LK30	7,0	1,60	0,40
LK27	7,0	2,00	0,14
LK26	7,0	1,60	0,40
LK25	7,0	1,50	0,21
LK22	7,0	2,00	0,07
LK23	7,0	1,90	0,18
LK24	7,0	2,00	0,11

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Pirminis proceso optimizavimo eksperimentas

Eksperimentiniai proceso stebėjimai parodė, kad esant $210 - 230 \pm 1,0$ °C adatos temperatūrai procesas išliko stabilus ir žymiai nekito, tačiau temperatūrai pasiekus $240 \pm 1,0$ °C, iš adatos ištekantis polimeras pradėjo rūkti ir procesas stjo. Šiuo atveju, elektroverpimu nepavyko sukurti pluoštų, o taip pat, dėl per didelės temperatūros ir greito polimero tiekimo debito ($235 \pm 1,0$ °C, 9,02 mg/min) gautame konstrukte (LK5) susidarė žirnio formos polimero deformacijos (žr. 3.1 pav.). Iš to galima spręsti, kad dėl per aukštos temperatūros polimeras galėjo suirti ir susidaryti skilimo produktai, kurie gali būti toksiški ląstelėms.

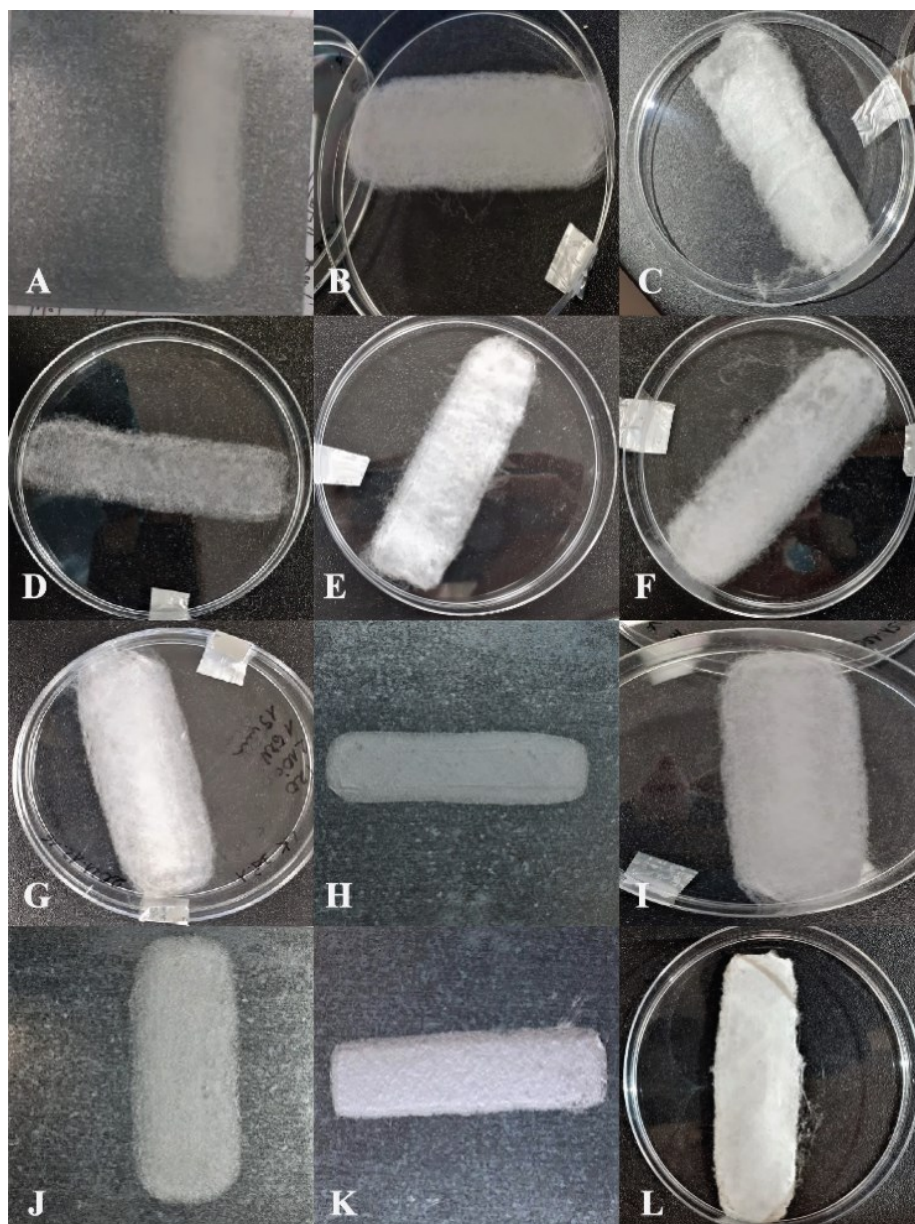


3.1 pav. PLA konstrukto SEM nuotrauka (200x didinimas), polimerinės deformacijos dėl temperatūros

Siekiant sukurti stabilią elektrifikuotą srovę, eksperimento metu, nuolat buvo keičiama įtampa. Dėl didesnio atstumo tarp elektrodų ir palyginus mažos įtampos, purkštuko gale (14 kV įtampa, 20 mm atstumas tarp adatos ir kolektoriaus) nesusiformavo Teiloro kūgis, procesas buvo nenuoseklus, konstrukto suformuoti nepavyko (LK6, LK7, LK9, LK10). Toks nenuoseklus, suskaidytas į lašelius, poveikis rastas kitoje literatūroje [5] vadinamas Rayleigh nestabilumu. Toliau įtampa buvo keičiama priklausomai nuo pasirinkto atstumo tarp metalinio adatos galiuko ir kolektoriaus, o, kad procesas išliktų stabilus, nuspręsta naudoti vienodas įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus vertes. Be to, vertinant polimero filamento tiekimo debitą, pastebėta, kad per maža (3,21 mg/min) polimero tiekimo debito vertė stabdė procesą, dėl to nesusidarydavo elektrifikuota srovė. Atsižvelgiant į tai, tolimesniam eksperimentui pasirinktas minimalus polimero tiekimo debitas – 4,18 mg/min. Stabilaus proceso vertės šiame eksperimente davusios palankiausias rezultatus buvo pasirinktos tolimesniems pluoštų formavimams.

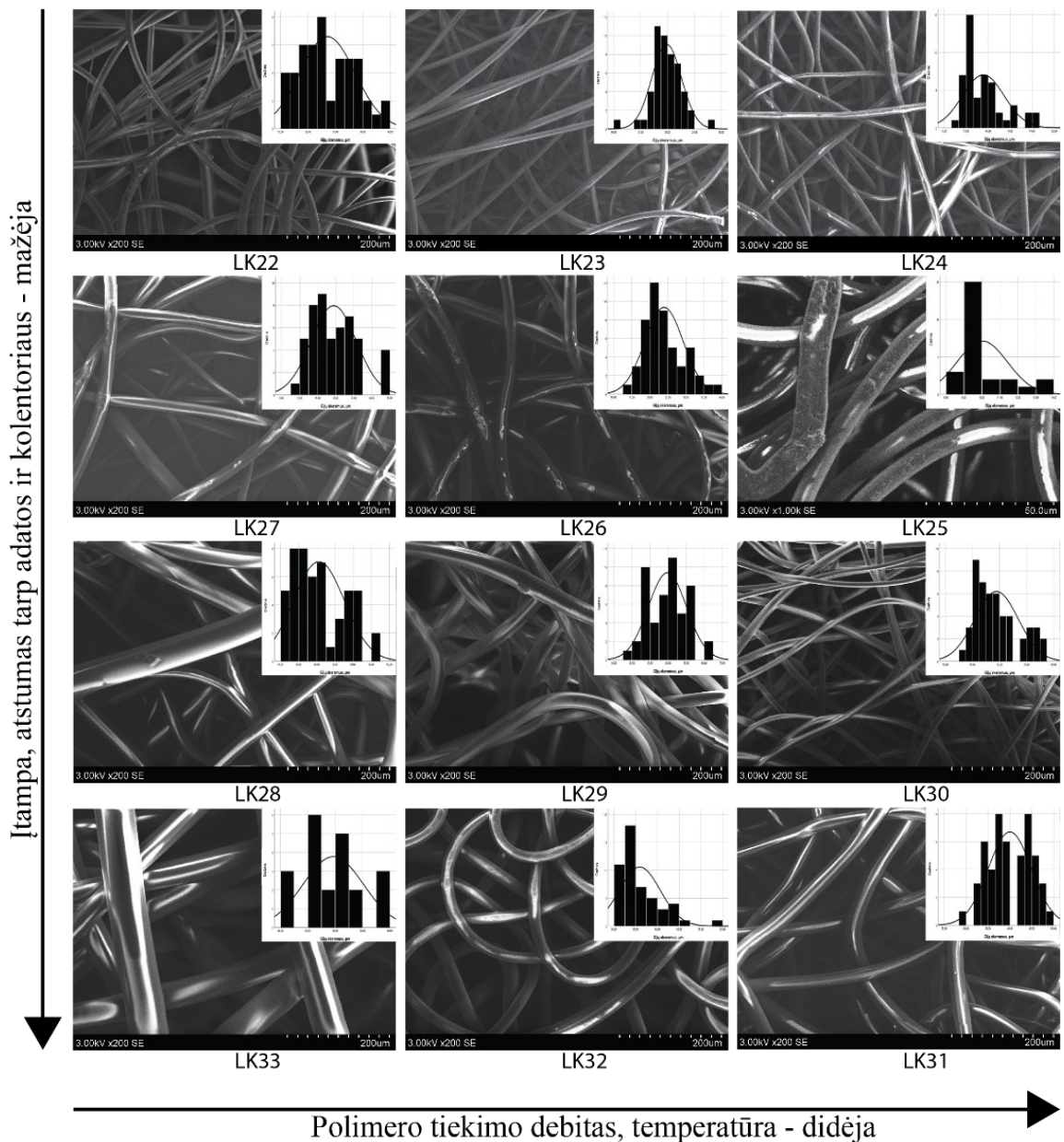
3.2. Skenuojančios elektroninės mikroskopijos analizė

3.2 paveiksle pateiktos lydalo elektroverpimu gautų PLA konstrukto nuotraukos, kurios pateiktos taip, kad iš kairės į dešinę didėja proceso parametrai (temperatūra ir polimero tiekimo debitas). Iš nuotraukų matyti, kad visi konstruktai tarpusavyje skiriasi savo pluošto paviršiaus architektūra. Priklausomai nuo pasirinktų proceso parametru, konstrukto struktūra keitėsi. Plonesni konstruktai gauti taikant minimalų polimero tiekimo debitą (žr. 3.2 pav. A, D, G, J). Siekiant tiksliai įvertinti PLA konstrukto paviršiaus morfologiją ir elektroverpimo parametru įtaką detaliau išanalizuota skenuojančios elektroninės mikroskopijos vaizdai.



3.2 pav. PLA konstruktų nuotraukos. A – mėginys LK33, B – mėginys LK32, C – mėginys LK31, D – mėginys LK28, E – mėginys LK29, F – mėginys LK30, G – mėginys LK27, H – mėginys LK26, I – mėginys LK25, J – mėginys LK22, K – mėginys LK23, L – mėginys LK24

Iš skenuojančios elektroninės mikroskopijos vaizdų pateiktų 3.3 paveiksle matoma, kad visi pagaminti konstruktai pasižymėjo pluoštine struktūra su atsitiktinai orientuotomis ir tarpusavyje susivijusiomis gijomis. Pastebėta, kad PLA konstruktams atstumas tarp adatos ir kolektoriaus ir įtampa tarp adatos ir kolektoriaus turėjo tiesioginį poveikį pluošto skersmeniui. LK22, LK23, LK24 (20 kV įtampa, 20 mm atstumas tarp adatos ir kolektoriaus) mėginiuose aiškiai matomos smulkiausios gijos lyginant su kitomis SEM fotografijomis. Panašios išvados buvo rastos tyrimuose su kitais polimerais [115,116]. Juose patvirtinama, kad išlaikant mažą atstumą tarp kolektoriaus ir adatos, susidaro didesnio skersmens gijos, o atstumą didinant konstrukto gijų skersmuo mažėja. Vizualiai, eksperimentai, kuriems taikytos tos pačios atstumo tarp adatos ir kolektoriaus ir įtampos sąlygos atrodo panašios. Tačiau tikslesnė duomenų analizė pateikta žemiau.

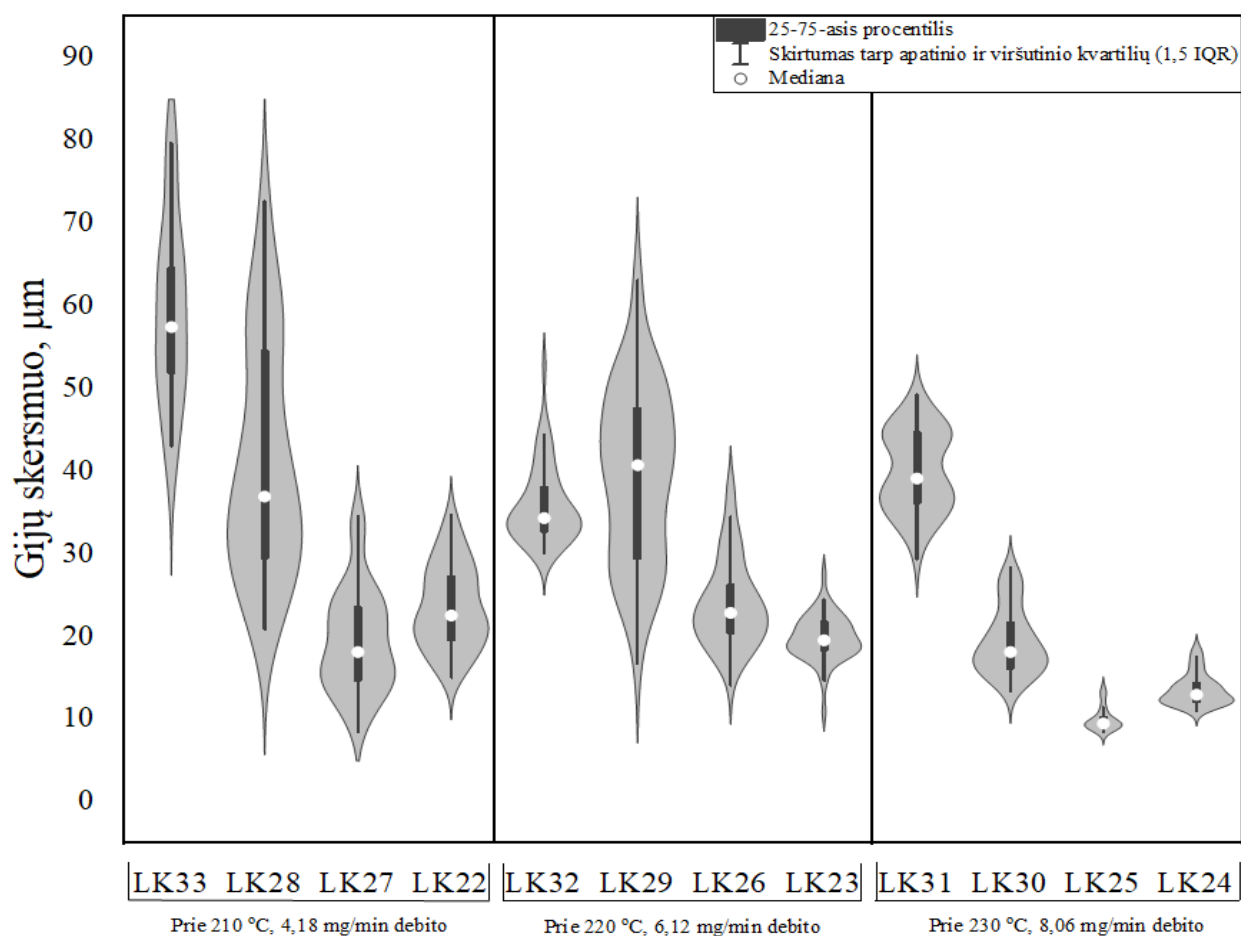


3.3 pav. Skirtingų mėginių SEM nuotraukos ir jų gijų skersmenų histogramos

3.3. Lydalo elektroverpimo proceso parametrų įtaka karkasų morfologijai

Suformuotų PLA konstrukčių gijų skersmens dydžio priklausomybė nuo įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus parametrų pavaizduota 3.4 grafike. Rezultatai grafike suskirstyti taip, kad kiekviena mėginių serija būtų vertinama išlaikant stabilias temperatūros ir polimero tiekimo debito vertes, todėl kaip nepriklausomi kintamieji laikyti šie parametrai. Kiekvienoje sekcijoje įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus vertės didėja iš kairės į dešinę (5, 10, 15, 20). Gautų konstrukčių gijų skersmuo svyruoja nuo 8,44 iki 79,638 μm . Visose grafiko srityse matoma priklausomybė – didėjant įtampai ir atstumui tarp adatos ir kolektoriaus gijų skersmuo mažėjo. Panaši priklausomybė nustatyta mokslininkų iš Pekino [117] – lydalo elektroverpimo metu, didėjant įtampai polietileno oksido pluošto gijų skersmuo mažėjo, nes pailgėjo srauto kelias ir padidėjo lenkimo dažnis. Išimties grafiko sekcijose – A ir C, eksperimentų LK22 ir LK24 (20 mm atstumas tarp adatos ir kolektoriaus ir 20 kV įtampa) gautos didesnio skersmens gijos už LK27 ir LK25 eksperimentus (15 mm atstumas tarp adatos ir kolektoriaus ir 15 kV įtampa). Be to, sekcijoje B, eksperimento LK29 (10 mm atstumas tarp adatos

ir kolektoriaus ir 10 kV įtampa) didžioji dalis, 75 % aptiktų gijų skersmens reikšmių svyravo nuo 29 iki 48 μm . Todėl vyravo didesnis gijų skersmuo nei LK32 bandinyje (5 mm atstumas tarp adatos ir kolektoriaus ir 5 kV įtampa), kuriame 75 % gijų skersmens reikšmių atitinkamai, 32 μm – 38 μm .



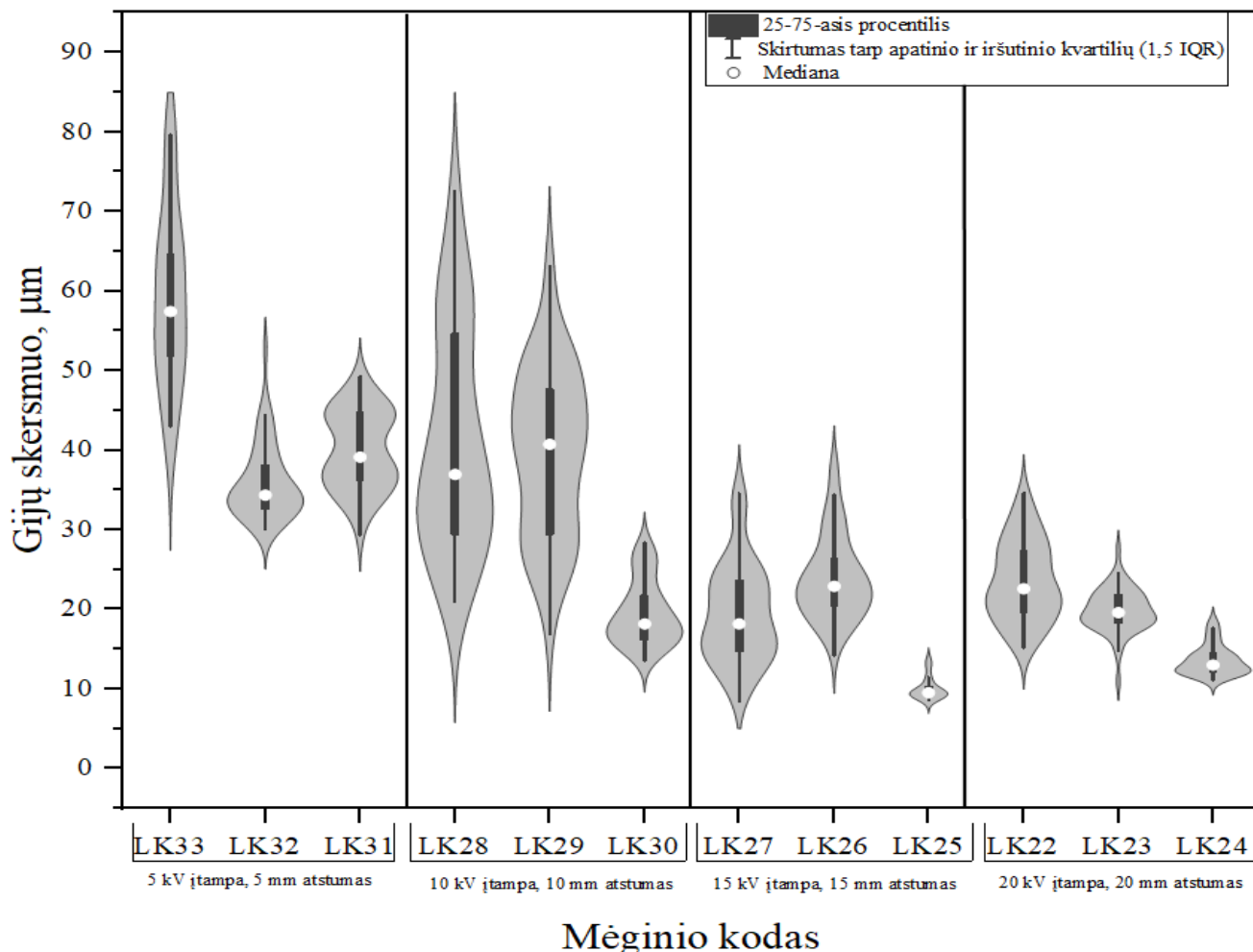
Mėginio kodas

3.4 pav. PLA konstrukčių gijų skersmens dydžio priklausomybė nuo įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus;

3.5 grafike pateikta gautų PLA konstrukčių gijų skersmens priklausomybė nuo adatos temperatūros ir filamenta tiekimo debito. Rezultatai grafike suskirstyti taip, kad kiekviena mėginių serija būtų vertinama išlaikant stabilias įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus vertes, todėl kiekvienoje sekcijoje kaip nepriklausomi kintamieji laikyti šie parametrai. Kiekvienoje sekcijoje polimero temperatūros ($210, 220, 230 \pm 1,0$ °C) ir tiekimo debito (4,18, 6,12, 8,06 mg/min) vertės didėja iš kairės į dešinę. Tarp visų grafiko sričių pastebima priklausomybė, didėjant temperatūrai ir polimero tiekimo debitui konstrukčių gijų skersmuo mažėjo. Gauta priklausomybė sutampa su rasta literatūroje, kurioje teigiama, kad esant aukštesnei temperatūrai, pluošto skersmuo mažėja [36].

Mažiausio skersmens gijų vertė užfiksuota LK27 bandinyje (15 mm atstumas tarp adatos ir kolektoriaus, 15 kV įtampa, $210 \pm 1,0$ °C temperatūra, 4,18 mg/min polimero tiekimo debitas), tačiau vidutiniškai mažiausio skersmens gijos nustatytos bandinyje LK25 (15 mm atstumas tarp adatos ir kolektoriaus, 15 kV įtampa, $230 \pm 1,0$ °C temperatūra, 8,06 mg/min polimero tiekimo debitas), gijų skersmuo svyravo siaurame diapazone, nuo 8,54 μm iki 13,67 μm . Šiuo atveju konstruktai buvo suformuoti esant didžiausioms polimero tiekimo debito ir temperatūros vertėms. Didžiausio

skersmens gijos aptiktos LK33, LK28 bandiniuose, esant žemiausioms polimero temperatūros ir tiekimo debito vertėms ($210 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $4,18 \text{ mg/min}$), atitinkamai gautos $59,29 \pm 11,10 \text{ }\mu\text{m}$ ir $41,15 \pm 14,11 \text{ }\mu\text{m}$. Apskritai, didžiausio skersmens gijos gautos A ir B grafiko sekcijų bandiniuose, kurių lydalo elektroverpimas atliktas taikant mažiausias atstumo tarp adatos ir kolektoriaus ir įtampos vertes (5 mm, 10 mm ir 5 kV, 10 kV).



3.5 pav. PLA konstrukčių gijų skersmens dydžio priklausomybė nuo temperatūros ir tiekimo debito

Eksperimentu pastebėta, kad esant žemesnei temperatūrai ir mažesniai debitui, konstrukčių gijų skersmuo gautas įvairesnis. Taip galėjo atsitikti dėl susidariusio per didelio elektrinio lauko, nes susiformavo srovės nestabilumas. Plačiausio diapazono gijų skersmuo vyravo LK28 mėginyje, kurio 75 % gijų skersmens reikšmių buvo ne mažesnės už $30 \text{ }\mu\text{m}$ ir ne didesnės už $55 \text{ }\mu\text{m}$. Atvirkščiai – gauti vienodžiausios sudėties pluoštai esant didžiausioms temperatūros ir debito vertėms. Vienintelė išimtis bandiniu LK31, tačiau šis skirtumas nėra žymus. Konstruktai, kuriuose gautos panašiausios gijos buvo LK24 ir LK25. LK25 mėginyje 75 % gijų skersmens reikšmė buvo nuo $12 \text{ }\mu\text{m}$ iki $14,5 \text{ }\mu\text{m}$, o LK22 – nuo $9 \text{ }\mu\text{m}$ iki $10,5 \text{ }\mu\text{m}$.

Atlikus elektroverpimo proceso sąlygų įtakos analizę gijų skersmeniui nustatyta, kad PLA filamentų kaitinimo temperatūra ir tiekimo debitas turėjo didžiausią įtaką konstrukčių morfologijai, parametru poveikis gijų skersmeniui buvo akivaizdus. Mažiausias gijų skersmuo ($10,01 \pm 1,40 \text{ }\mu\text{m}$) gautas esant aukščiausioms temperatūros ir polimero tiekimo debito vertėms ($230 \text{ }^\circ\text{C}$, $8,06 \text{ mg/min}$). Taip pat, gijų

skersmeniui reikšmę turėjo įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus kitimas, esant didesnėms šių parametru vertėms (15 kV, 15 mm, 20 kV, 20 mm) pastebimos smulkesnės gijos.

3.4. Fizikocheminė PLA konstrukčių analizė

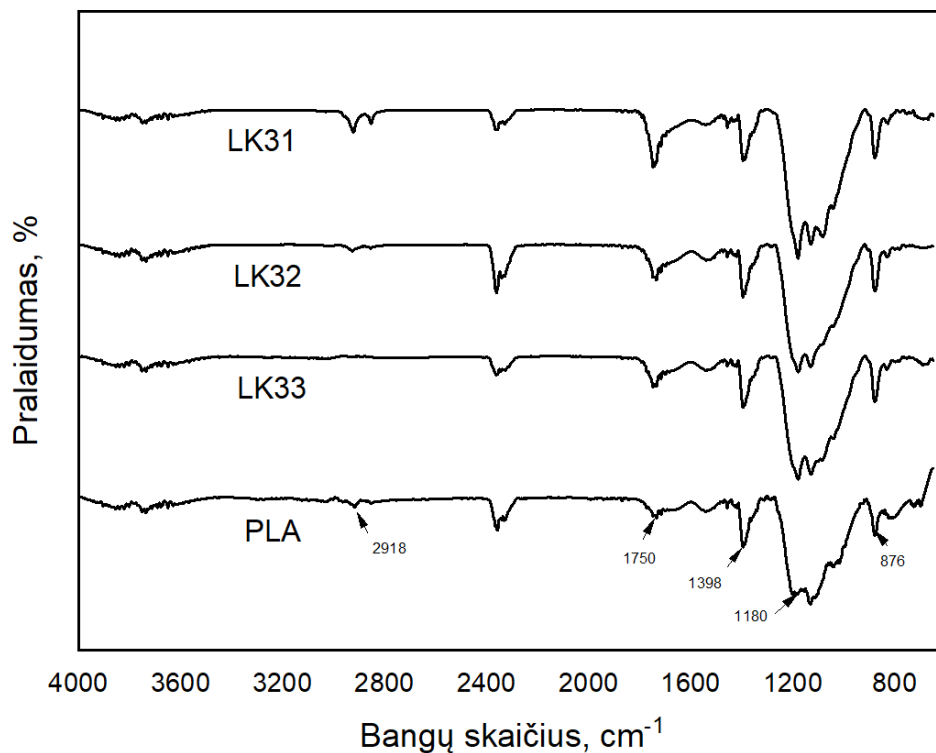
3.4.1. PLA konstrukčių cheminės savybės

Siekiant nustatyti, ar lydalo elektroverpimo sąlygos turėjo neigiamą poveikį konstrukčių cheminėms struktūroms buvo atlikta Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija. Užfiksuoti neapdorotų PLA granulių ir PLA konstrukčių FTIR spektrai pateikiami 4000 – 650 cm^{-1} diapazone, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 paveiksluose. Eksperimentai suskirstyti taip, kad kiekviename grafike būtų išlaikomos vienodos įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus sąlygos. Visuose paveiksluose palyginimui šalia pateikiamas neapdorotų PLA granulių FTIR spektras. 3.1 lentelėje pateikiami PLA granulių funkcinės grupės ir virpesiai identifikuoti FTIR spektruose.

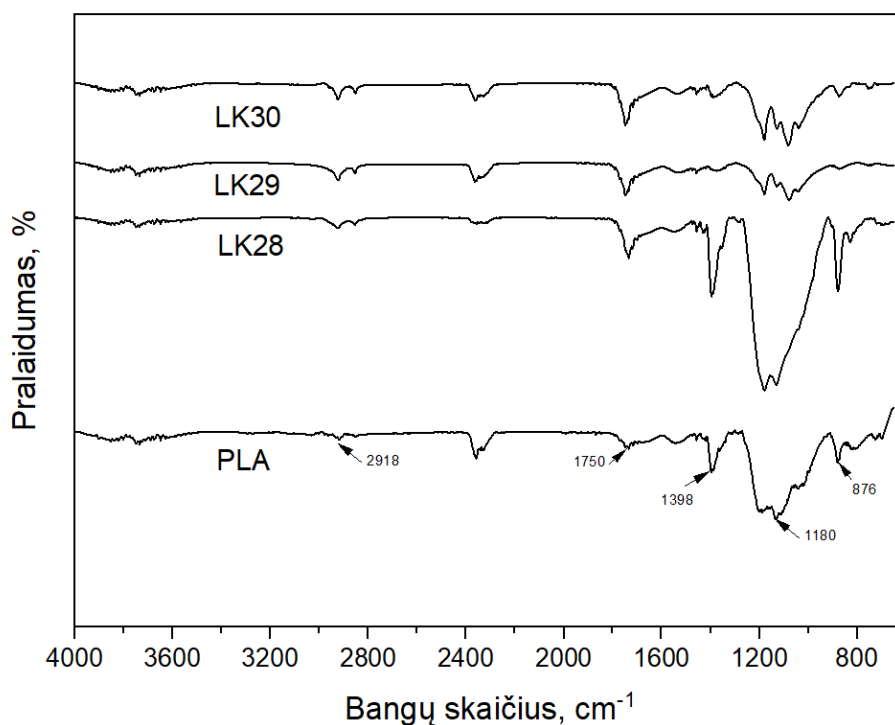
Lentelė 3.1. FTIR spektre identifikuotos smailės

Bangos skaičius, cm^{-1}	Funkcinė grupė	Virpesių tipas
2918	C–H	Valentiniai
1750	C=O	Valentiniai
1398	C–H	Deformaciniai
1180	C–O	Valentiniai
876	C–C	Deformaciniai

Remiantis literatūra PLA būdingi C=O, $-\text{CH}_3$, C–O valentiniai ir $-\text{CH}_3$ deformaciniai virpesiai atitinkamai esant 1746, 2946, 1080 ir 1452 cm^{-1} [118,119]. Panašios PLA smailės užfiksuotos ir kituose tyrimuose [119,120,121,122,123]. Neapdorotų PLA granulių spektras rodo tipines PLA smailes. Šiuo atveju, PLA granulių spektre intensyviausia plati smailė pirštų antspaudų srityje ties 1180 cm^{-1} . Šie valentiniai virpesiai rodo esteriams būdingus C–O ryšius. Intensyvi plona smailė ties 1398 cm^{-1} yra būdinga simetriniams ir asimetriniams $-\text{CH}_3$ deformaciniams virpesiams. Nežymūs asimetriniai ir simetriniai valentiniai C–H ryšių virpesiai, būdingi PLA $-\text{CH}_3$ grupei, pastebimi ties 2918 cm^{-1} . Valentiniai virpesiai ties 1750 cm^{-1} atskleidžia karbonilo grupės (C=O) buvimą PLA. Sritis ties 876 cm^{-1} taip pat aptinkama kitose literatūrose [122,124] susijusi su amorfine ir kristaline PLA fazėmis.



3.6 pav. PLA granulių ir PLA konstrukto, pagamintų esant 5 kV įtampai ir 5 mm atstumui tarp adatos ir kolektoriaus, FTIR grafikai

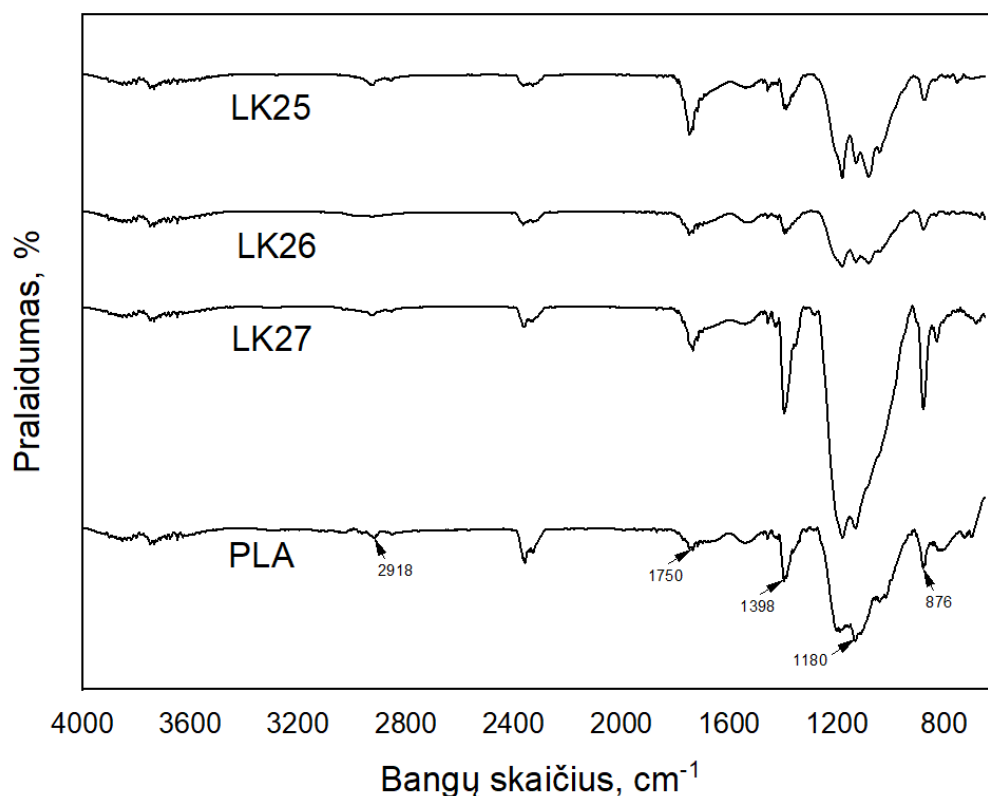


3.7 pav. PLA granulių ir PLA konstrukto, pagamintų esant 10 kV įtampai ir 10 mm atstumui tarp adatos ir kolektoriaus, FTIR grafikai

Visi gauti spektrai buvo panašūs ir turėjo PLA būdingas smailes. Skirtumas tarp PLA konstrukto FTIR spektrų pastebimas ties 1750 cm⁻¹ sritimi. Nusakanti oksidacijos lygį smailė karbonilo grupės

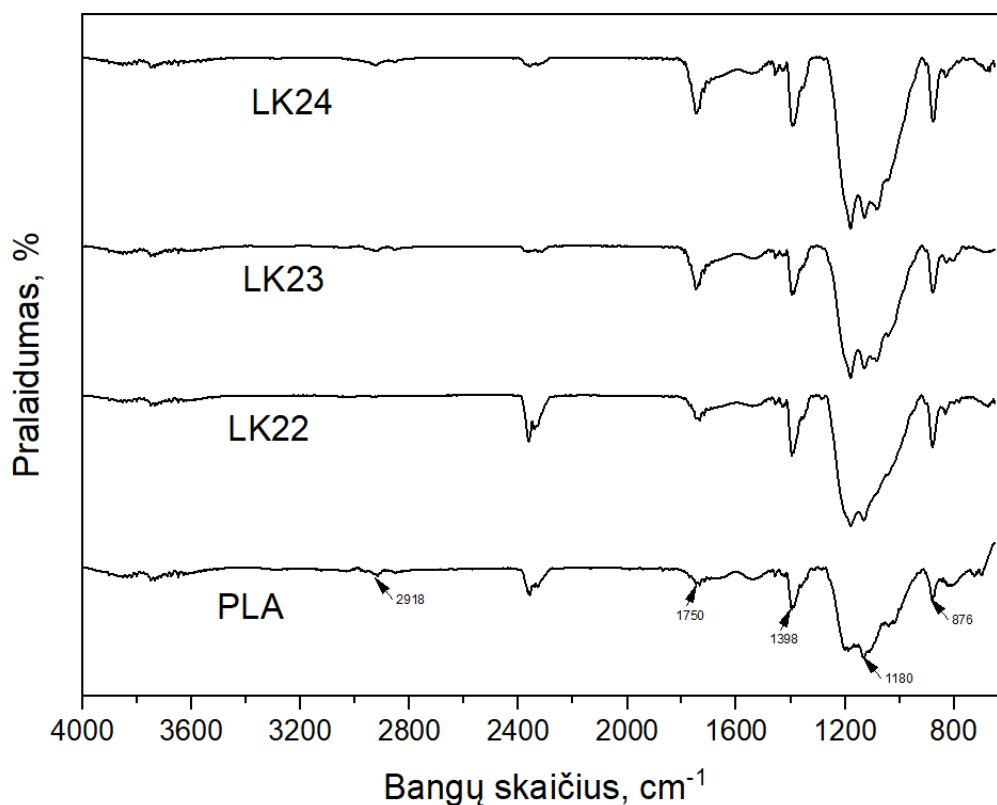
(C=O) srityje pastebėta intensyvesnė. Eksperimentuose (LK31, LK30, LK25, LK24), kurių lydalo elektroverpimas atliktas esant aukščiausiai temperatūrai – $230 \pm 1,0$ °C, ši smailė buvo intensyviausia. Toks pokytis galėjo atsirasti dėl per aukštos temperatūros, įvykus polimero oksidacijai. Šių smailių intensyvumas didėjo didėjant temperatūrai.

Sritis ties 876 cm^{-1} yra susijusi ne tik su deformaciniais C–C virpesiais, bet ir su amorfine ir kristaline PLA fazėmis [125]. Eksperimentų LK27 ($210 \pm 1,0$ °C, 4,18 mg/min, 15 mm, 15 kV), LK28 ($210 \pm 1,0$ °C, 4,18 mg/min, 10 mm, 10 kV), LK24 ($230 \pm 1,0$ °C, 8,06 mg/min, 20 mm, 20 kV) spektruose ši smailė intensyvesnė už PLA granulių spektro smailę. Šių smailių intensyvumo padidėjimas rodo, kad kristališkumas bandinių padidėjo.



3.8 pav. PLA granulių ir PLA konstrukčių, pagamintų esant 15 kV įtampai ir 15 mm atstumui tarp adatos ir kolektoriaus, FTIR grafikai

Bandinių LK26 ($220 \pm 1,0$ °C, 6,12 mg/min, 15 mm, 15 kV), LK29 ($220 \pm 1,0$ °C, 6,12 mg/min, 10 mm, 10 kV) ir LK30 ($230 \pm 1,0$ °C, 8,06 mg/min, 10 mm, 10 kV) spektruose smailės ties 1398, 1180 ir 876 cm^{-1} sritimi sumažėjusios, toks juostų intensyvumo sumažėjimas gali reikšti, kad polimeras degradavo ir jo kristališkumas mažėjo.



3.9 pav. PLA granuliu ir PLA konstruktu, pagamintu esant 20 kV itampai ir 20 mm atstumui tarp adatos ir kolektoriaus, FTIR grafikai

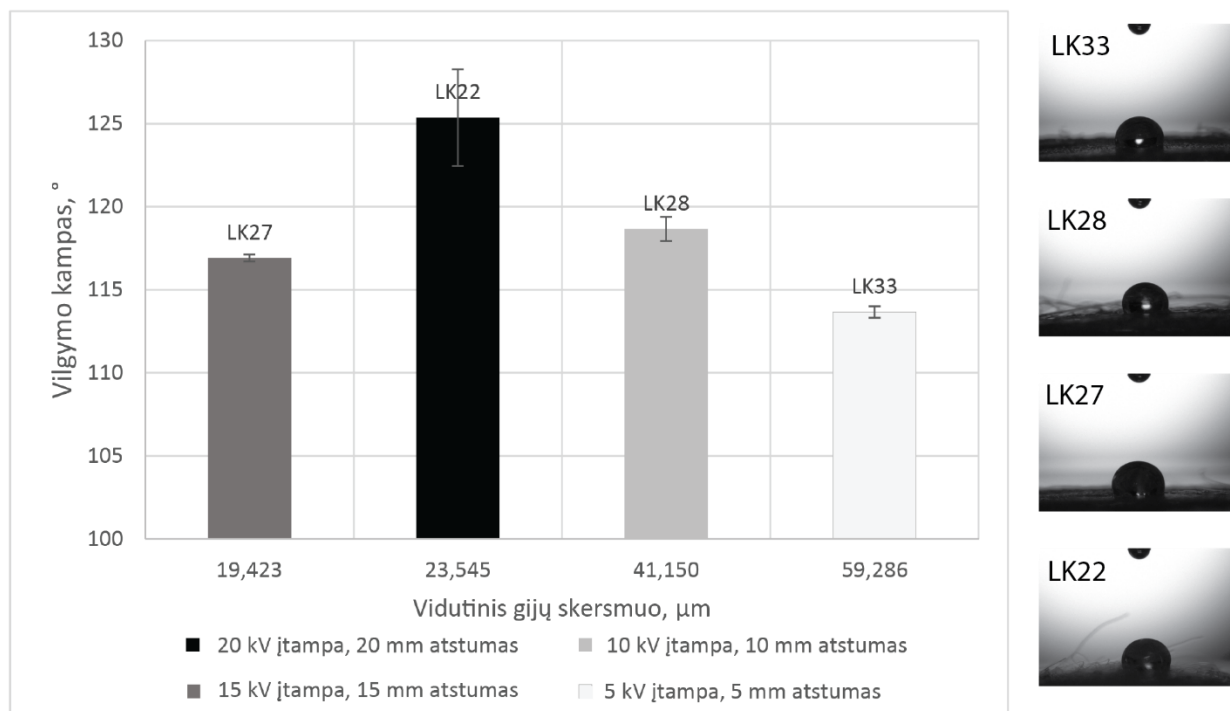
Remiantis gautais rezultatais nustatyta, kad PLA konstruktu strukturoje buvo visos smailės, atitinkančios grynas PLA granules, o tai įrodo, kad PLA konstruktai buvo sėkmingai pagaminti. Taip pat, nustatyta, kad aukšta ($230 \pm 1,0$ °C) temperatūra, turėjo didžiausią įtaką PLA konstruktu cheminei struktūrai. Karboksilo grupių kiekis buvo tiesiogiai susijęs su temperatūra lydalo elektroverpime. Grupių atsiradimas byloja apie galimą terminę oksidaciją. Palyginus spektrus, itampa ir atstumas tarp adatos ir kolektoriaus neturėjo žymios itakos PLA konstruktu smailių intensyvumui, kas rodo, kad nesukėlė jokių cheminių PLA pokyčių. PLA konstruktu, kurie buvo suformuoti esant mažiausiai itampai ir atstumui tarp adatos ir kolektoriaus, spektrai buvo panašiausi į PLA granuliu spektrą.

3.4.2. Vandens vilgymo kampo nustatymas konstruktu paviršiuje

Siekiant įvertinti elektroverpimo sąlygu itaką konstruktu hidrofiliškumui / hidrofobiškumui, buvo išmatuoti eksperimentu vandens vilgymo kampai. Remiantis mokslinėje literatūroje pateikiama informacija [126], jei vandens vilgymo kampas yra mažesnis nei 90 ° medžiaga yra hidrofiliinė, nes vandens ir paviršiaus sąveikos jėgos beveik prilygsta vandens sanglaudos jėgoms. Paviršiai, kuriu vandens vilgymo kampas yra didesnis nei 90 °, yra laikomi hidrofobiniais.

Nepriklausomai nuo elektroverpimo proceso sąlygu visų eksperimentu vandens vilgymo kampai buvo didesni nei 90 °. Eksperimentu nustatyta, kad suformuoti PLA konstruktai sunkiai absorbuoja vandenį ir pasižymi hidrofobinėmis savybėmis. PLA konstruktu hidrofobiškumą taip pat patvirtino mokslininku komanda [127]. Tirpalo elektroverpimu suformotu PLA pluoštu vandens vilgymo

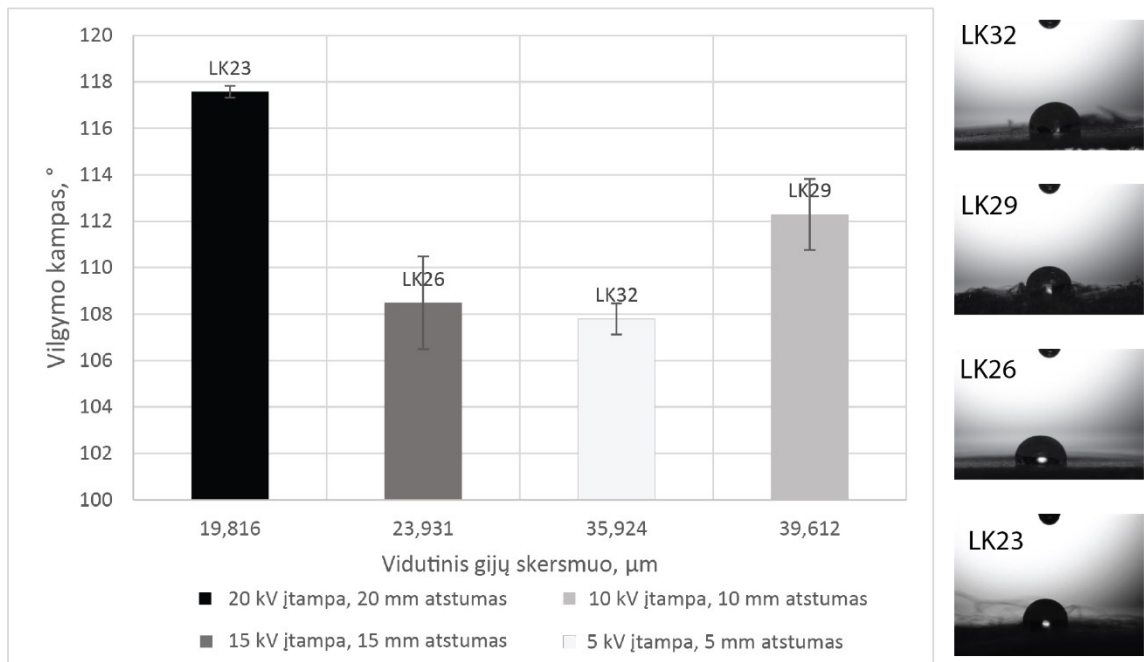
kampas gautas $131,9^\circ$. Panašų vilgymo kampą išmatavo kita mokslininkų komanda [128] iš Kinijos. Tirpalo elektroverpimu suformuotų pluoštų vandens vilgymo kampas gautas $129,2^\circ$.



3.10 pav. Vandens vilgymo kampo priklausomybė nuo gijų skersmens (esant 210°C temperatūrai, $4,18\text{ mg/min}$ tiekimo debitui); vandens lašo ant eksperimentų vaizdai

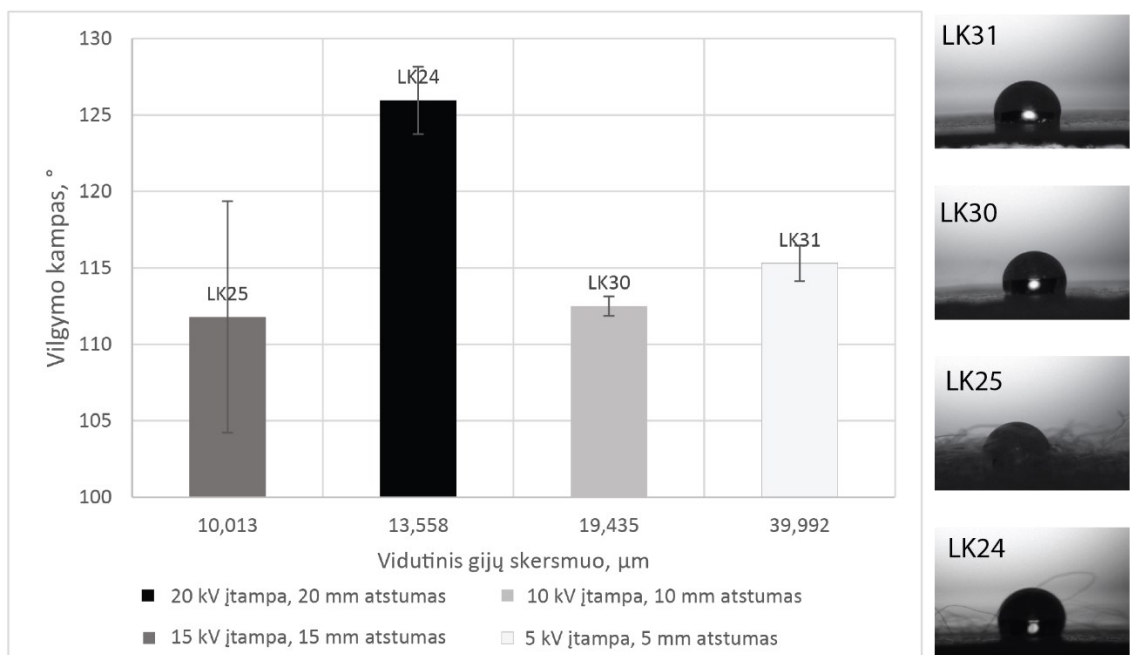
3.10, 3.11, 3.12 pav. grafikuose pateikiamos išmatuotos PLA konstrukčių vandens vilgymo kampų verčių priklausomybės nuo gijų skersmens. Visi grafikai tarpusavyje skiriasi elektroverpimo proceso sąlygomis – temperatūros ir polimero tiekimo debito vertėmis. Eksperimentuose vidutinė vandens vilgymo kampo vertė svyruoja nuo $107,8 \pm 0,4^\circ$ iki $126,0 \pm 2,2^\circ$. Pastebėta, kad visų eksperimentų atveju, hidrofobiškesni konstruktai gauti taikant 20 kV įtampą ir 20 mm atstumą tarp adatos ir kolektoriaus elektroverpimo sąlygas (LK22, LK23, LK24). Jų vandens kontakto kampai gauti atitinkamai $125,4 \pm 2,9^\circ$, $117,6 \pm 0,3^\circ$, $126,0 \pm 2,2^\circ$. Atvirkščiai, esant mažiausiai įtampai ir atstumui tarp adatos ir kolektoriaus (5 kV, 5 mm) gauti hidrofiliškesni konstruktai už kitus.

Lyginant visus grafikus tarpusavyje, galima pastebėti, kad mažiausios vandens vilgymo kampo vertės gautos (žr. 3.11 pav.) su konstruktais, suformuotais esant vidutinėms proceso sąlygoms – $220 \pm 1,0^\circ\text{C}$ temperatūrai ir $6,18\text{ mg/min}$ tiekimo debitui. Mažiausiai hidrofobiški konstruktai nustatyti LK32 (5 kV, 5 mm, $220 \pm 1,0^\circ\text{C}$, $6,12\text{ mg/min}$), atitinkamai jų vandens vilgymo kampai, $107,8 \pm 0,4^\circ$ ir $108,6 \pm 0,2^\circ$. Hidrofobiškiausias nustatytas konstruktas (vilgymo kampas $126,0 \pm 2,2^\circ$), kuris suformuotas esant didžiausioms elektroverpimo sąlygoms (20 kV įtampa, 20 mm atstumas tarp adatos ir kolektoriaus, $230 \pm 1,0^\circ\text{C}$, $8,06\text{ mg/min}$ tiekimo debitas). Šiuo eksperimentu gautos vienos smulkiausių gijų – $13,56 \pm 1,89\ \mu\text{m}$.



3.11 pav. Vandens vilgymo kampo priklausomybė nuo gijų skersmens (esant 220 °C temperatūrai, 6,12 mg/min tiekimo debitui); vandens lašo ant eksperimentų vaizdai

3.10, 3.11 pav. grafikuose pastebima priklausomybė, mažesnės vandens vilgymo kampo reikšmės užfiksuotos su stambesnių gijų konstruktais. Išimtis gauta su eksperimentu LK29, kurio vilgymo kampo vertė gauta didesnė ($112,9 \pm 1,5$ °) už LK32 eksperimentą ($107,8 \pm 0,4$ °). Tam įtakos galėjo turėti platesnis LK29 konstrukto gijų diapazonas ($39,61 \pm 10,62$ μm) nei LK32 eksperimento – $35,92 \pm 4,72$ μm.

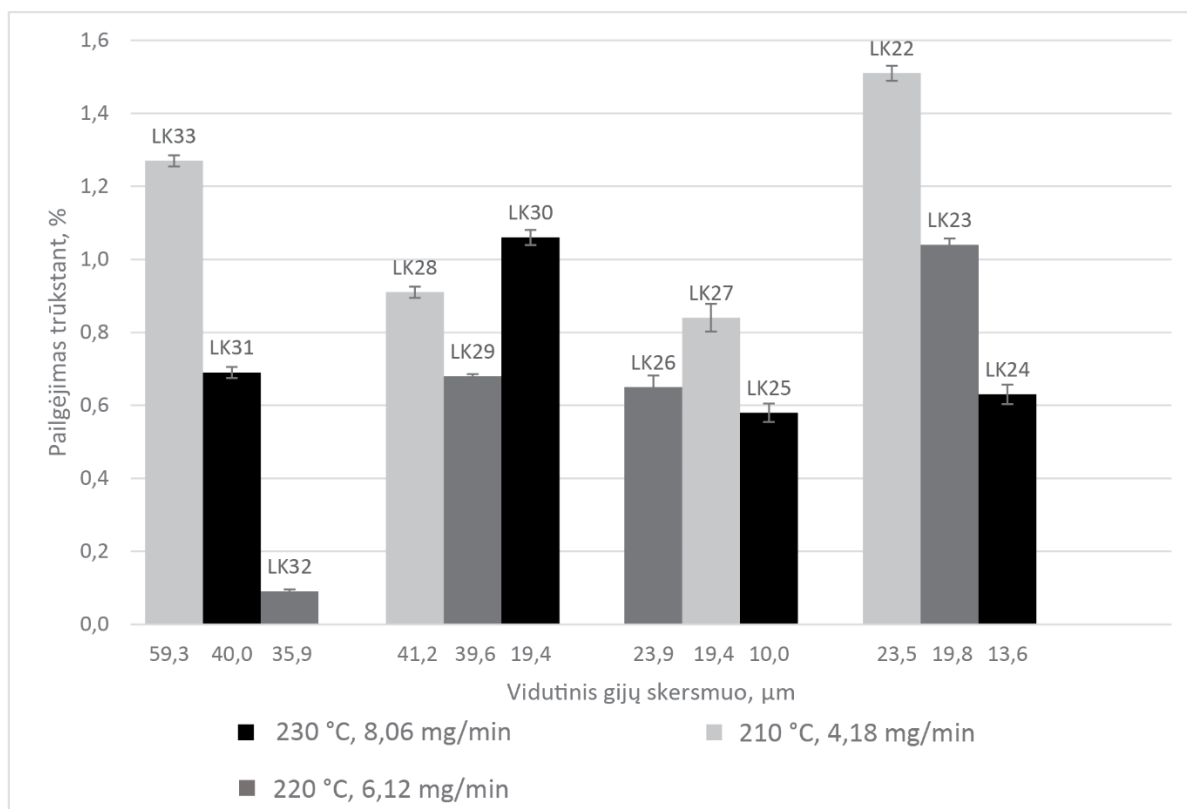


3.12 pav. Vandens vilgymo kampo priklausomybė nuo gijų skersmens (esant 230 °C temperatūrai, 8,06 mg/min tiekimo debitui); vandens lašo ant eksperimentų vaizdai

Atliktas vandens vilgymo kampo tyrimas ir rezultatai parodė, kad esant mažesnėms įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus vertėms gauti hidrofiliškesni konstruktai. Įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus sąlygų didėjimas vandens vilgymo kampą padidino 11 ± 1 % visuose eksperimentuose. Analizuojant eksperimentus nustatyta gijų skersmens įtaka, vandens vilgymo kampas gautas mažesnis eksperimentuose su stambesnėmis gijomis. Gautos konstrukto sąlyčio su vandens lašu kampų vertės sutampa su kitų mokslinių grupių [127,128] gautomis vertėmis su tirpalo elektroverpimu suformuotais bandiniais. Be to, pastebėta, kad keičiant elektroverpimo parametrus pavyko gauti mažesnio hidrofobiškumo konstruktus nei rastoje literatūroje.

3.4.3. Mechaninių savybių įvertinimas tempiant

Atlikus mechaninių savybių tyrimą tempiant, gautos PLA konstrukto įtempių ir deformacijų kreivės (žr. 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17 pav.), iš kurių išskirti pagrindiniai parametrai, apibūdinantys konstrukto mechanines savybes: pailgėjimas trūkimo metu, stipris tempiant, tampros modulis. Šiuos parametrus sąlygoja daugelis konstrukto veiksnių, įskaitant, storį, gijų skersmenį, cheminę sudėtį [129]. Toliau aptariami konstrukto mechaninių savybių rezultatai ir nustatoma priklausomybė tarp jų ir ankstesnių tyrimų rezultatų.

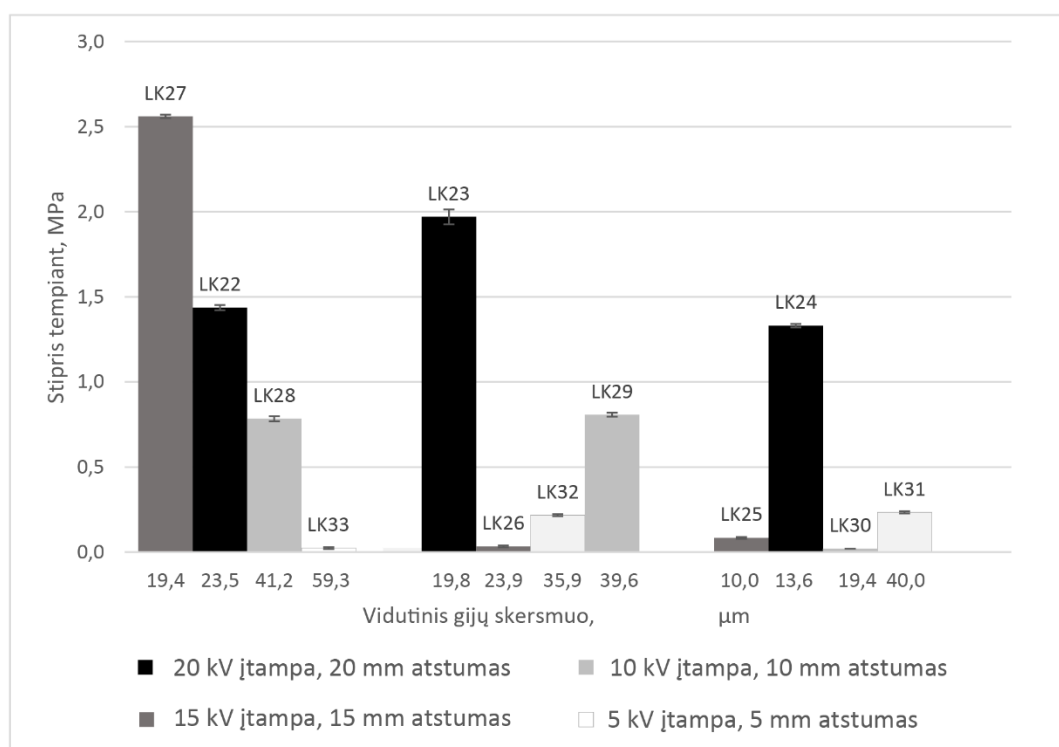


3.13 pav. Lydalo elektroverpimu gautų PLA konstrukto grafikas vaizduojantis pailgėjimo trūkstant priklausomybę nuo gijų skersmens

PLA konstrukto pailgėjimo trūkstant gautų verčių priklausomybės nuo gijų skersmens pateikiamos 3.13 paveiksle. Grafike eksperimentai suskirstyti į 4 grupes, esant skirtingiems įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus lydalo elektroverpimo parametrų (5 kV, 5 mm, 10 kV, 10 mm, 15 kV, 15mm, 20 kV, 20mm). Grafike pailgėjimo trūkstant vertė svyravo nuo $0,09 \pm 0,01$ % iki $1,51 \pm 0,02$ %. Pastebėta, kad mažėjant konstrukto vidutiniam gijų skersmeniui pailgėjimo trūkstant vertė mažėjo.

Išimtis – eksperimentas LK30 (10 kV, 10 mm, 8,06 mg/min, 230 °C), kurio pailgėjimo trūkstant vertė ($1,06 \pm 0,02$ %) gauta didesnė už LK29 ($0,68 \pm 0,01$ %) ir LK28 ($0,91 \pm 0,02$ %) eksperimentus. Tai galėjo sąlygoti beveik dvigubai smulkesnė konstrukto LK30 ($19,44 \pm 4,96$ μm) pluoštų sandara už LK28 ($41,15 \pm 14,11$ μm) ir LK29 ($39,61 \pm 10,62$ μm) eksperimentus.

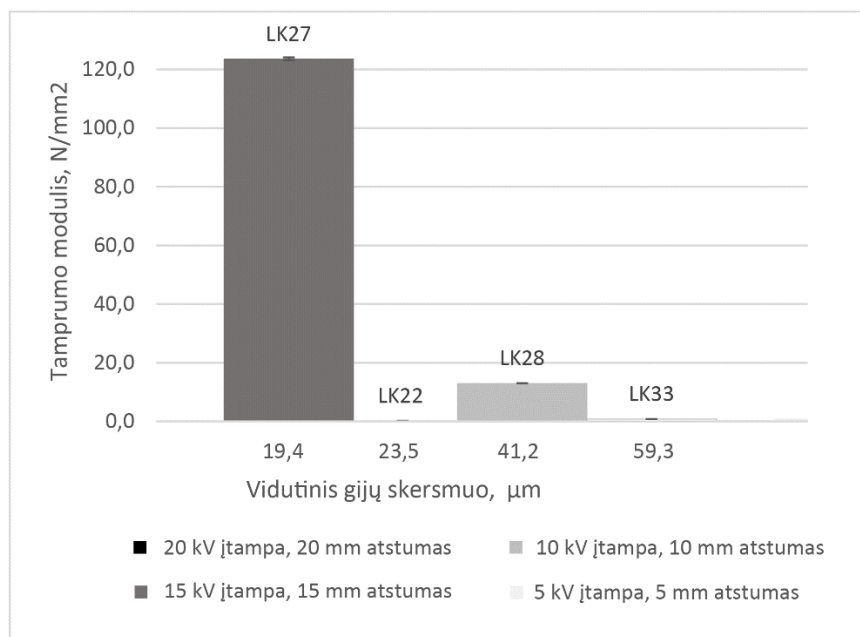
Mažiausia pailgėjimo trūkstant vertė gauta eksperimentu LK32 (5 kV, 5 mm, 6,18 mg/min, 220 °C), kas sąlygoja konstrukto trapumą. Didžiausias pailgėjimas trūkstant ($1,51 \pm 0,02$ %) gautas eksperimentu LK22 (20 kV, 20 mm, 4,12 mg/min, 210 °C) esant vidutiniam gijų skersmeniui ($23,55 \pm 5,05$ μm). Didelis pailgėjimas trūkstant ($1,27 \pm 0,02$ %) gautas su konstruktu, kurio gijų skersmuo gautas ($59,29 \pm 11,10$ μm) didžiausias.



3.14 pav. Lydalo elektroverpimu gautų PLA konstrukčių grafikas vaizduojantis stiprį trūkimo metu

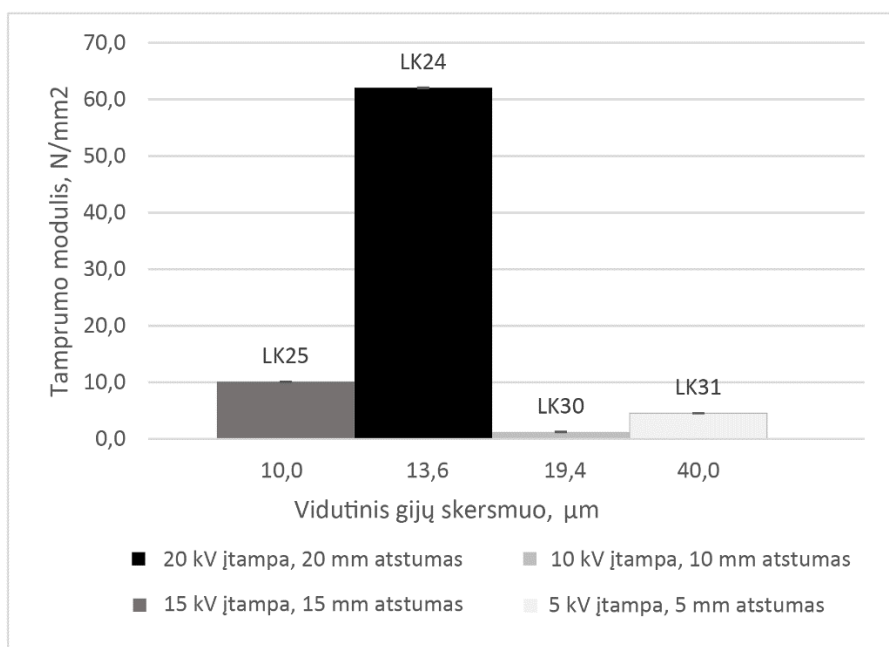
Lydalo elektroverpimu suformuotų PLA konstrukčių mechaninių savybių tyrimo stiprio tempiant priklausomybės nuo gijų skersmens pateikiamos 3.14 paveiksle. Grafike konstruktai suskirstyti į 3 grupes, kurios tarpusavyje skiriasi temperatūros (210, 220, 230 °C) ir tiekimo debito (4,18 6,12, 8,06 mg/min) vertėmis, kurios didėja iš kairės į dešinę. Mažiausios stiprio tempiant vertės gautos LK30 ($0,02 \pm 0,01$ MPa), LK33 ($0,02 \pm 0,01$ MPa), LK26 ($0,03 \pm 0,01$ MPa) eksperimentais. Jų gijų skersmuo buvo atitinkamai $19,44 \pm 4,03$ μm, $59,29 \pm 11,10$ μm, $23,93 \pm 5,34$ μm. Tai rodo, kad konstrukčių gijų skersmuo neturėjo žymios įtakos stiprumo tempiant rezultatams.

Didžiausia stiprio trūkimo metu vertė gauta LK27 bandiniu – $2,56 \pm 0,01$ MPa, kurio gijų skersmuo atitinkamai – $19,42 \pm 6,27$ μm. Iš FTIR grafikų, šiame bandinyje nustatytos amorfinių savybių padidėjimas galėjo turėti įtakos stiprumo tempiant padidėjimui. Didžiausias stipris trūkimo metu vyravo esant didžiausioms įtampoms ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus (20 mm, 20kV) parametrams.



3.15 pav. Lydalo elektroverpimu gautų PLA konstrukčių tamprumo modulio priklausomybė nuo gijų skersmens; konstrukčių, suformuotų esant 210 °C ir 4,12 mg/min tiekimo debitui, rezultatai

Išmatuotas tampros modulis arba kitaip vadinamas Young'o modulis parodė reikšmingus rezultatus. 3.15, 3.16, 3.17 paveiksluose pateikiamos tampros modulio rezultatų priklausomybės nuo PLA konstrukčių gijų skersmens. Skirtinguose grafikuose pateikiami konstrukčių, suformuotų esant skirtingoms elektroverpimo sąlygoms (temperatūrai, polimero tiekimo debitui), rezultatai. Pastebėta, kad didėjant konstrukčių gijų skersmeniui tamprumo modulis vyravo mažesnis.

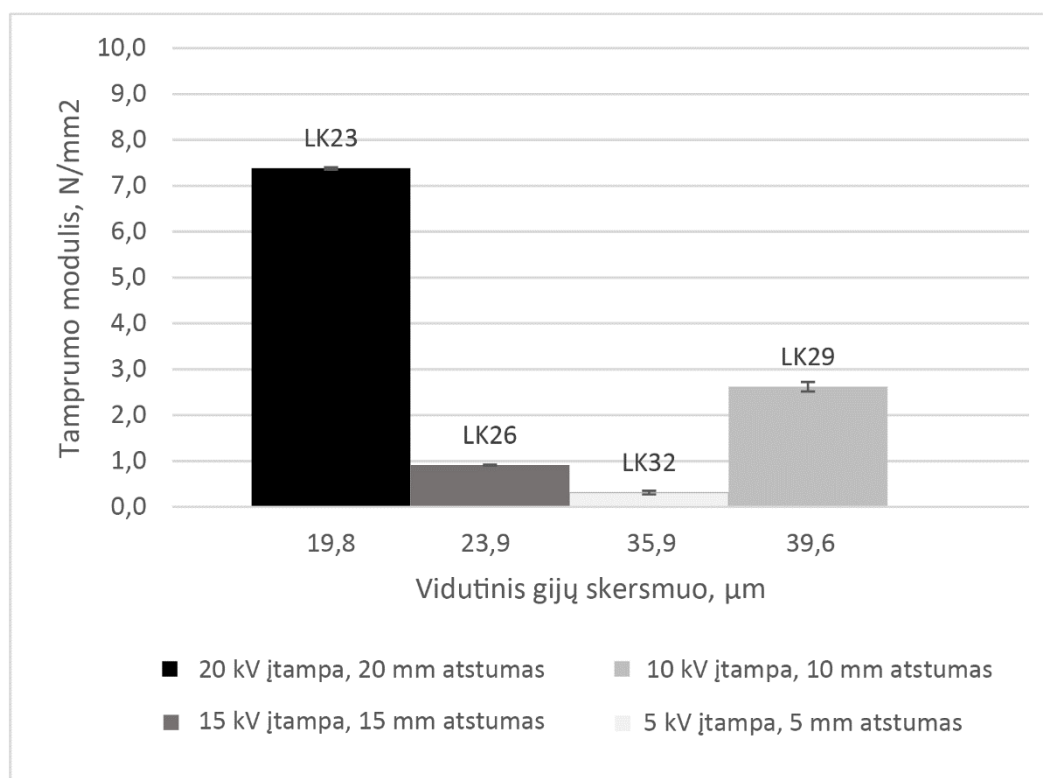


3.16 pav. Lydalo elektroverpimu gautų PLA konstrukčių tamprumo modulio priklausomybė nuo gijų skersmens; konstrukčių, suformuotų esant 220 °C ir 6,18 mg/min tiekimo debitui, rezultatai

Didžiausios tampros vertės užfiksuotos eksperimentuose – LK27 ($123,6 \pm 0,5 \text{ N}/\text{mm}^2$), LK24 ($62,1 \pm 0,04 \text{ N}/\text{mm}^2$) ir LK28 ($13,0 \pm 0,02 \text{ N}/\text{mm}^2$), kurių gijų skersmenys atitinkamai $19,42 \pm 6,27 \mu\text{m}$,

13,56 ± 1,89 μm, 41,15 ± 14,11 μm. Kitose literatūrose [129,130] teigiama, kad kristališkumo padidėjimas padidina Young'o modulį. Ankščiau aptartuose FTIR spektruose kristališkumo padidėjimu pasižymėjo, būtent, visi šie eksperimentai eksperimentai.

Gautų konstrukčių (LK25, LK24, LK28, LK27) tampros modulis atitinka natūralios odos tamprumo modulį, kuris šaltiniuose pateikiamas nuo 5 – 150 MPa [131,132,133][134]. Remiantis eksperimentų FTIR spektrais didžiausiu amorfiškumu pasižymėjusių konstrukčių (LK26, LK30, LK29) tampros modulis gautas itin mažas. Mažiausias tamprumo modulis (0,2 ± 0,03 N/mm²) gautas eksperimentu LK22, kurio gijų skersmuo – 23,55 ± 5,05 μm. Apskritai, daugelio eksperimentų Young'o modulio vertės nesiekė 10 N/mm². Lyginant Young'o modulio vertes su lydalo elektroverpimo sąlygomis, nepastebėta ryškios priklausomybės.



3.17 pav. Lydalo elektroverpimu gautų PLA konstrukčių tamprumo modulio priklausomybė nuo gijų skersmens; konstrukčių, suformuotų esant 230 °C ir 8,06 mg/min tiekimo debitui, rezultatai

Mechaninių savybių rezultatai parodė reikšmingus skirtumus. Kaip ir pateikiama kitose literatūrose [117] PLA konstruktai yra standūs ir trapūs. Konstruktai turėjo didelį tempimo modulį ir atsparumą tempimui, bet labai ribotą pailgėjimą trūkimo metu. Gauti rezultatai rodo, jog stipris tempiant, tampros modulis ir pailgėjimas tempiant labiausiai padidėja, didėjant įtampai ir atstumui tarp adatos ir kolektoriaus. Geriausiomis mechaninėmis savybėmis pasižymėjo smulkių gijų LK24, LK23 konstruktai (13,56 ± 1,89 μm ir 19,82 ± 2,75 μm) suformuoti esant didžiausioms įtampoms (20 kV) ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus vertėms (20 mm). Kinijos Mokslininkai [134] ištyrė suformuotų PLA membranų mechanines savybes. Rezultatai atskleidė, kad Young'o modulis buvo 93,65 MPa, tempiamasis stipris – 1,74 MPa, o pailgėjimas trūkimo metu 60,27 %. Gautos PLA konstrukčių Young'o modulio ir tempiamojo stiprio vertės yra artimos Kinijos mokslininkų rezultatams, tačiau pailgėjimas trūkimo metu gautas ženkliai mažesnis.

Rekomendacijos

Atlikus tyrimą, lydalo elektroverpimu suformuoti PLA karkasai su atsitiktinai orientuotomis ir tarpusavyje susivijusiomis smulkiomis gijomis, kurios užtikrina efektyvią ląstelių infiltraciją. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad gauti audinių inžinerijos keliamus reikalavimus atitinkantys PLA karkasai. Manoma, kad PLA karkasai ateityje gali būti pritaikomi minkštųjų audinių regeneracijoje – epiteliniams, nerviniams audiniams ar kraujagyslėms regeneruoti. Tačiau, siekiant užtikrinti šių karkasų efektyvumą, saugumą ir pritaikomumą ateityje reikalingi išsamūs tyrimai *in vitro* ir *in vivo* aplinkose.

Išvados

1. Atlikus literatūros analizę nustatytos savybės, kurias turi atitikti audinių inžinerijai skirti karkasai: bioskaidumas, biosuderinamumas, tvarumas, pakankamos mechaninės savybės. Lydalo elektroverpimui parinkta mažai ištirta žaliava – polipieno rūgštis, kuri tenkina ne tik audinių inžinerijos reikalavimus, bet ir žalios chemijos principus.
2. Tyrimo metu naudojant lydalo elektroverpimo įrangą, pagamintą modifikuojant 3D spausdintuvą Kauno technologijos universitete, suformuoti audinių inžinerijai skirti PLA karkasai. Proceso metu buvo keičiami elektroverpimo parametrai: PLA filamento kaitinimo temperatūra (210 °C, 220 °C, 230 °C), tiekimo debitas (4,18 mg/min, 6,12 mg/min, 8,06 mg/min), įtampa (5 kV, 10 kV, 15 kV, 20 kV) ir atstumas tarp adatos ir kolektoriaus (5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm).
3. Atlikti cheminių, fizikinių, mechaninių savybių įvertinimo tyrimai atskleidė, kad
 - lydalo elektroverpimu suformuoti karkasai turėjo PLA būdingas funkcines grupes. Remiantis gautais FTIR spektrais identifikuotos funkcinių grupių smailės ties 1180 cm^{-1} (C–O), 1398 cm^{-1} (simetriniai ir asimetriniai deformaciniai –CH₃ virpesiai), 2918 cm^{-1} (simetriniai ir asimetriniai valentiniai –CH₃ virpesiai), 1750 cm^{-1} (C=O), 876 cm^{-1} (deformaciniai C–C virpesiai) bangos skaičiumi. Nustatyta, kad aukšta temperatūra, turėjo neigiamą įtaką PLA konstruktų cheminei struktūrai. $230 \pm 1,0$ °C temperatūra suformuotų karkasų spektruose, C=O grupei būdinga suintensyvėjusi smailė (1750 cm^{-1}) parodė įvykusios terminės oksidacijos požymius. Mažiausiai pakitę nuo grynos PLA spektrai buvo karkasų, suformuotų esant mažiausiam atstumui (5 mm) ir įtampai (5 kV) tarp adatos ir kolektoriaus.
 - keičiant elektroverpimo parametrus sumažintas PLA karkasų hidrofobiškumas. Atlikus vandens vilgymo kampo analizę, nustatyta, kad mažėjant įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus parametru vertėms vandens vilgymo kampas sumažėjo 11 ± 1 % visuose eksperimentuose.
 - Gauti PLA karkasai turėjo labai ribotą pailgėjimą trūkimo metu, kuris mažėjo didėjant temperatūros ir tiekimo greičio vertėms. Didžiausias pailgėjimas trūkstam ($1,51 \pm 0,02$ %) gautas esant mažiausiai temperatūrai ir tiekimo debitui (4,12 mg/min, 210 °C), bet didžiausioms įtampos ir atstumo tarp adatos ir kolektoriaus (20 kV, 20 mm) vertėms. Tempimo metu geriausiomis mechaninėmis savybėmis ($2,56 \pm 0,01$ MPa, $123,6 \pm 0,5$ N/mm²) pasižymėjo PLA karkasai, suformuoti esant mažiausios temperatūros ir tiekimo debito parametrams (15 kV, 15 mm, $210 \pm 1,0$ °C, 4,18 mg/min).
4. Ištyrus pagrindinius lydalo elektroverpimo metodo parametrus: įtampa ir atstumas tarp adatos ir kolektoriaus, PLA filamento kaitinimo temperatūra, tiekimo debitas, įvertinta įtaka PLA karkasų morfologijai. Nustatyta, kad PLA karkasų gijų skersmuo mažėjo didėjant visų parametru vertėms. Didžiausios tam įtakos turėjo PLA filamento kaitinimo temperatūra ir tiekimo debitas. Mažiausias gijų skersmuo ($10,01 \pm 1,40$ μm) gautas esant aukščiausioms temperatūros ir polimero tiekimo debito vertėms (230 °C, 8,06 mg/min).

Literatūros sąrašas

1. GIANNOUDIS, P. V., POUNTOS, I. Tissue regeneration: The past, the present and the future. *Injury*. [interaktyvus]. 2005, 36 (4), S2–S5 [žiūrėta 2021-09-10]. ISSN 00201383. Prieiga per doi: 10.1016/j.injury.2005.10.006
2. The Council of Europe: guardian of Human Rights, Democracy and the Rule of Law for 700 million citizens. [žiūrėta 2021-09-10]. Prieiga per internetą: <https://www.coe.int/en/web/portal/home>
3. KRAFTS, K. Tissue Repair. *Encyclopedia of Toxicology* [interaktyvus]. 3-oji laida. Elsevier, 2014. pp. 577–583. [žiūrėta 2021-09-09]. ISBN 9780123864543. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00355-9
4. RAHMATI, M. et al. Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*. Elsevier, 2021, 117. pp. 1–39. [žiūrėta 2021-09-20]. ISSN 00796425. Prieiga per doi: 10.1016/j.pmatsci.2020.100721
5. ZHOU, H. Electrospun fibers from both solution and melt: processing, structure and property. *the American Chemical Society*. 2007. [žiūrėta 2021-09-25]. ISSN 1520-5126. Prieiga per: <https://hdl.handle.net/1813/5162>
6. CHANDRA, P.K. et al. Tissue engineering: Current status and future perspectives. *Principles of Tissue Engineering*. [interaktyvus]. 5-oji laida. Elsevier, 2020. p. 1–35. [žiūrėta 2021-09-30]. ISBN 9780128184226. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00004-6>
7. BRAGHIROLI, D.I. et al. Electrospinning for regenerative medicine: A review of the main topics. *Drug Discovery Today*. 2014, 19 (6), 743–753. [žiūrėta 2022-01-05]. ISSN 18785832. Prieiga per doi: 10.1016/j.drudis.2014.03.024
8. Pasaulio sveikatos organizacija. [interaktyvus]. [žiūrėta 2022-05-14]. Prieiga per internetą: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
9. Osteoarthritis in Europe | Pfizer & The Economist Intelligence Unit. [interaktyvus]. [žiūrėta 2022-05-14]. Prieiga per internetą: <https://osteoarthritisineurope.eiu.com/>
10. GAZZARRI, M. et al. Fibrous star poly(ϵ -caprolactone) melt-electrospun scaffolds for wound healing applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2013, 28 (5), 492–507. [žiūrėta 2022-01-10]. ISSN 0883-9115. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1177%2F0883911513494625>
11. KLEIN, T.J. et al. Strategies for zonal cartilage repair using hydrogels. *Macromolecular Bioscience*. 2009, 9 (11), 1049–1058. [žiūrėta 2022-01-20]. ISSN 16165187. Prieiga per doi: 10.1002/mabi.200900176
12. JIANG, T. et al. Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*. 2015, 46, 1–24. [žiūrėta 2022-01-20]. ISSN 00796700. Prieiga per doi: 10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001
13. AMINI, S. et al. Natural and synthetic polymeric scaffolds used in peripheral nerve tissue engineering: Advantages and disadvantages. *Polymers for Advanced Technologies*. 2021, 32 (6), 2267–2289. [žiūrėta 2022-01-21]. ISSN 10991581. Prieiga per doi: 10.1002/pat.5263
14. EMING, S.A. et al. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*. 2014, 6 (265), 1–36. [žiūrėta 2022-01-17]. ISSN 19466242. Prieiga per doi: 10.1126/scitranslmed.3009337
15. SINGHVI, M.S. et al. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *Journal of Applied Microbiology*. 2019, 127 (6), 1612–1626. [žiūrėta 2022-02-01]. ISSN 13652672. Prieiga per doi: 10.1111/jam.14290

16. MAO, A.S., MOONEY, D.J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015. 112 (47), 14452–14459. [žiūrēta 2022-02-25]. ISSN 10916490. Prieiga per doi: 10.1073/pnas.1508520112
17. FARRUGIA, B.L. et al. Dermal fibroblast infiltration of poly(ϵ -caprolactone) scaffolds fabricated by melt electrospinning in a direct writing mode. *Biofabrication*. 2013, 5 (2), 1–11. [žiūrēta 2022-02-25]. ISSN 17585082. Prieiga per doi: 10.1088/1758-5082/5/2/025001
18. COLOMBO, F. et al. Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives. In *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2017, 5 (1), 1–8. [žiūrēta 2022-02-25]. ISSN 2213-879X. Prieiga per doi: 10.1016/j.jmau.2016.05.002
19. UDOMLUCK, N. et al. Surface functionalization of dual growth factor on hydroxyapatite-coated nanofibers for bone tissue engineering. In *Applied Surface Science*. 2020, 520, 1–11. [žiūrēta 2022-03-02]. ISSN 01694332. Prieiga per doi: 10.1016/j.apsusc.2020.146311
20. BRUŽAUSKAITĖ, I. et al. Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects. *Cytotechnology*. 2016, 68 (3), 355–369. [žiūrēta 2022-03-08]. ISSN 15730778. Prieiga per doi: 10.1007/s10616-015-9895-4
21. IDASZEK, J. et al. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine. *Applied Surface Science*. 2016, 388, 62–774. [žiūrēta 2022-03-07]. ISSN 01694332. Prieiga per doi: 10.1016/j.apsusc.2016.03.038
22. JIN, G. et al. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2011, 7 (8), 3113–3122. [žiūrēta 2022-03-08]. ISSN 18787568. Prieiga per doi: 10.1016/j.actbio.2011.04.017
23. KU, S.H. - PARK, C.B. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2010, 31 (36), 9431–9437. [žiūrēta 2022-03-31]. ISSN 01429612. Prieiga per doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.071
24. WEI, J.D. et al. Characterizations of chondrocyte attachment and proliferation on electrospun biodegradable scaffolds of PLLA and PBSA for use in cartilage tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*. 2012, 26 (8), 963–985. [žiūrēta 2022-03-29]. ISSN 08853282. Prieiga per doi: 10.1177/0885328210390401
25. PARK, K. et al. Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2007, 18 (4), 369–382. [žiūrēta 2022-03-29]. ISSN 15685624. Prieiga per doi: 10.1163/156856207780424997
26. BOLAND, E.D. et al. Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly(glycolic acid) for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research – Part B Applied Biomaterials*. 2004, 71 (1), 144–152. [žiūrēta 2022-03-29]. ISSN 00219304. Prieiga per doi: 10.1002/jbm.b.30105
27. SAHOO, S. et al. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research – Part A*. 2010, 93 (4), 1539–1550. [žiūrēta 2022-03-29]. ISSN 15493296. Prieiga per doi: 10.1002/jbm.a.32645
28. EDELMAN, E.R. et al. Perivascular and Intravenous Administration of Basic Fibroblast Growth Factor: Vascular and Solid Organ Deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. [interaktyvus]. 1993, 90 (4), 1513–1517. [žiūrēta 2022-03-08] Prieiga per doi: 10.1073/pnas.90.4.1513
29. BACHS-HERRERA, A. et al. Melt electrospinning of polymers: Blends, nanocomposites, additives and applications. *Applied Sciences (Switzerland)*. 2021, 11 (4), 1–39. [žiūrēta 2022-03-16]. ISSN 20763417. Prieiga per doi: 10.3390/app11041808

30. COSGRIFF-HERNANDEZ, E., MIKOS, A.G. New biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Pharmaceutical Research*. 2008, 25 (10), 2345–2347. [žiūrēta 2022-03-16]. ISSN 07248741. Prieiga per doi: 10.1007/s11095-008-9666-4
31. JONES, J.R. Scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*. 2005, p. 201–214. [žiūrēta 2022-03-08]. ISBN 9781855737372. Prieiga per doi: 10.1533/9781845690861.4.201
32. BONFERONI, M.C. et al. Biomaterials for soft tissue repair and regeneration: A focus on italian research in the field. *Pharmaceutics*. 2021, 13 (9), 1–39. [žiūrēta 2022-03-08]. ISSN 19994923. Prieiga per doi: 10.3390/pharmaceutics13091341
33. LIU, X., MA, P.X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng*. 2004, 32 (3), 477–86. [žiūrēta 2022-03-08]. ISSN 1521-6047. Prieiga per doi: 10.1023/b:abme.0000017544.36001.8e.
34. WAKE, M.C. et al. Biodegradable Polymer Scaffolds to Regenerate Organs. *Biopolymers II*. 2005, pp 245–274. [žiūrēta 2022-03-08]. ISBN 9783540491026. Prieiga per doi: 10.1007/3540587888_18
35. VLIERBERGHE, S. VAN et al. Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair. In *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*. 2014. p. 335–390. [žiūrēta 2022-04-23]. ISBN 9780857096968. Prieiga per doi: 10.1533/9780857097033.2.335
36. MUERZA-CASCANTE, M.L. et al. Melt electrospinning and its technologization in tissue engineering. *Tissue Engineering –Part B: Reviews*. 2015, 21 (2), 187–202. [žiūrēta 2022-04-31]. ISSN 19373376. Prieiga per doi: 10.1089/ten.teb.2014.0347
37. YANG, C. et al. Fibers by electrospinning and their emerging applications in bone tissue engineering. *Applied Sciences (Switzerland)*. 2021, 11(19), 1–21. [žiūrēta 2022-04-31]. ISSN 20763417. Prieiga per doi: 10.3390/app11199082
38. PINA, S. et al. Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Materials*, 2019, 12(11), 1–42. [žiūrēta 2022-04-31]. ISSN 19961944. Prieiga per doi: 10.3390/ma12111824
39. HANANI, Z.A.N. Gelatin. *Encyclopedia of Food and Health*. 2015. p. 191–195. [žiūrēta 2022-03-08]. ISBN 9780123849533. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00347-0
40. ALIPAL, J. et al. A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. In *Materials Today: Proceedings*. 2019. p. 240–250. [žiūrēta 2022-04-31]. ISSN 22147853. Prieiga per doi: 10.1016/j.matpr.2020.12.922
41. LAI, J.Y. Biocompatibility of chemically cross-linked gelatin hydrogels for ophthalmic use. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010, 21 (6), 1899–1911. [žiūrēta 2022-05-02]. ISSN 09574530. Prieiga per doi: 10.1007/s10856-010-4035-3
42. YANG, G. et al. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Scientific Reports*. 2018, 8 (1), 1–13. [žiūrēta 2022-04-15]. ISSN 20452322. Prieiga per doi: 10.1038/s41598-018-20006-y
43. KAMIDE, K., DOBASHI, T. Molecular weight and molecular weight distribution. *Physical Chemistry of Polymer Solutions* [interaktyvus]. 2000, 562–638. [žiūrēta 2022-03-18]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-044489430-4/50010-7
44. VLIERBERGHE, S. VAN et al. Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair. *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*. 2014. p. 335–390. [žiūrēta 2022-04-31]. ISBN 9780857096968. Prieiga per doi: 10.1533/9780857097033.2.335

45. BISWAL, T. Biopolymers for tissue engineering applications: A review. *Materials Today: Proceedings*. 2019, 1, 397–402. [žiūrėta 2022-02-10]. ISSN 22147853. Prieiga per doi: 10.1016/j.matpr.2020.09.628
46. NIKKHAH, M. et al. gelatin-based biomaterials for tissue engineering and stem cell bioengineering. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*. [interaktyvus]. 1-oji laida. 2016, 37–62. [žiūrėta 2022-04-01]. ISBN 978-1118478059. Prieiga per doi: 10.1002/9781119126218.ch3
47. ARAMWIT, P. et al. A comparative study of type A and type B gelatin nanoparticles as the controlled release carriers for different model compounds. *Materials Express*. 2015, 5 (3), 241–248. [žiūrėta 2022-04-01]. ISBN 978-1118478059. Prieiga per doi: 10.1002/9781119126218.ch3
48. XIONG, S. et al. A Gelatin-sulfonated Silk Composite Scaffold based on 3D Printing Technology Enhances Skin Regeneration by Stimulating Epidermal Growth and Dermal Neovascularization. *Scientific Reports*. 2017, 7(1), 1–12. [žiūrėta 2022-04-17]. ISSN 20452322. Prieiga per doi: 10.1038/s41598-017-04149-y
49. SULAIMAN, S. Bin et al. Gelatin microsphere for cartilage tissue engineering: Current and future strategies. *Polymers*. 2020, 12 (10), 1-16. [žiūrėta 2022-04-17]. ISSN 20734360. Prieiga per doi: 10.3390/polym12102404
50. RODRIGUES, I.C.P. et al. Low-cost hybrid scaffolds based on polyurethane and gelatin. *Journal of Materials Research and Technology*. 2020, 9 (4), 7777–7785. [žiūrėta 2022-04-17]. ISSN 22387854. Prieiga per doi: 10.1016/j.jmrt.2020.04.049
51. BELLO, A. B. et al. 2020
52. LI, G. et al. Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2020, 25 (21), 1–18. [žiūrėta 2022-04-17]. ISSN 14203049. Prieiga per doi: 10.3390/molecules25215023
53. NOFAR, M. et al. Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, 125, 307–360. [žiūrėta 2022-05-02]. ISSN 18790003. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002
54. FARAH, S. et al. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 107, 367–392. [žiūrėta 2022-04-10]. ISSN 18728294. Prieiga per doi: 10.1016/j.addr.2016.06.012
55. PANG, X. et al. Polylactic acid (PLA): Research, development and industrialization. *Biotechnology Journal*. 2010, 5 (11), 1125–1136, [žiūrėta 2022-04-10]. ISSN 18606768. Prieiga per doi: 10.1002/biot.201000135
56. New PLA Granules are Sustainable and Environmentally Friendly. [interaktyvus]. [žiūrėta 2022-02-02]. Prieiga per internetą: <https://bioplasticsnews.com/2019/09/13/new-pla-granules-goodfellow/>
57. GUPTA, B. et al. Poly(lactic acid) fiber: An overview. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2007, 32 (4), 455–482. [žiūrėta 2022-02-21]. ISSN 00796700. Prieiga per doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005
58. GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*. 2001, 9 (2), 63–84. [žiūrėta 2022-04-01]. ISSN 15662543. Prieiga per doi: 10.1023/A:1020200822435
59. CHI, H.Y. et al. Fabrication of polylactic acid/paclitaxel nano fibers by electrospinning for cancer therapeutics. *BMC Chemistry*. 2020, 14 (1), 1–12. [žiūrėta 2022-04-01]. ISSN 2661801X. Prieiga per doi: 10.1186/s13065-020-00711-4

60. NING, C. et al. Electroactive polymers for tissue regeneration: Developments and perspectives. *Progress in Polymer Science*. 2018, 81, 144–162. [žiūrēta 2022-04-05]. ISSN 00796700. Prieiga per doi: 10.1016/j.progpolymsci.2018.01.001
61. Lactic acid | HC3H5O3 - PubChem. [interaktyvus]. [žiūrēta 2022-04-24]. Prieiga per internetą: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-acid>
62. SILVA, D. DA et al. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chemical Engineering Journal*. 2018, 340, 9–14. [žiūrēta 2022-04-05]. ISSN 13858947. Prieiga per doi: 10.1016/j.cej.2018.01.010
63. DAVACHI, S.M., KAFFASHI, B. Polylactic Acid in Medicine. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*. 2015, 54 (9), 944–967. [žiūrēta 2022-04-20]. ISSN 15256111. Prieiga per doi: 10.1080/03602559.2014.979507
64. MONTANÉ, X. et al. Synthesis and synthetic mechanism of Polylactic acid. *Physical Sciences Reviews*. 2020, 5 (12), 1–11. [žiūrēta 2022-04-20]. ISSN 2365659X. Prieiga per doi: 10.1515/psr-2019-0102
65. MEKONNEN, T. et al. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *Journal of Materials Chemistry A*. 2013, Vol. 1 (43), 13379–13398. [žiūrēta 2022-04-15]. ISSN 20507496. Prieiga per doi: 10.1039/c3ta12555f
66. ZAABA, N.F., JAAFAR, M. A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation. *Polymer Engineering and Science*. 2020, 60(9), 2061–2075. [žiūrēta 2022-02-21]. ISSN 15482634. Prieiga per doi: 10.1002/pen.25511
67. BECK, L.R. et al. New long-acting injectable microcapsule contraceptive system. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1979, 135 (3), 419–426. [žiūrēta 2022-03-01]. ISSN 00029378. Prieiga per doi: 10.1016/0002-9378(79)90717-8
68. STENER, S. et al. A long-term, prospective, randomized study comparing biodegradable and metal interference screws in anterior cruciate ligament reconstruction surgery: Radiographic results and clinical outcome. *American Journal of Sports Medicine*. 2010, 38 (8), 1598–1605. [žiūrēta 2022-03-16]. ISSN 03635465. Prieiga per doi: 10.1177/0363546510361952
69. AZIMI, B. et al. Poly (ϵ -caprolactone) Fiber: An Overview. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. [interaktyvus]. 2014, 9 (3), 74–90. [žiūrēta 2022-03-25]. Prieiga per internetą: <http://www.jeffjournal.org>
70. DWIVEDI, R. et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2020, 10 (1), 381–388. [žiūrēta 2022-04-01]. ISSN 22124268. Prieiga per doi: 10.1016/j.jobcr.2019.10.003
71. LABET, M. - THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: A review. *Chemical Society Reviews*. 2009, 38 (12), 3484–3504. [žiūrēta 2022-02-21]. ISSN 14604744. Prieiga per doi: 10.1039/b820162p
72. AFGHAH, F. et al. Biomimicry in bio-manufacturing: Developments in melt electrospinning writing technology towards hybrid biomanufacturing. *Applied Sciences (Switzerland)*. 2019, 9 (17), 1–24. [žiūrēta 2022-02-21]. ISSN 20763417. Prieiga per doi: 10.3390/app9173540
73. NIAOUNAKIS, M. Properties. *Biopolymers: Processing and Products* [interaktyvus]. 2015, 79–116. [žiūrēta 2022-02-21]. ISSN 23146141. Prieiga per internetą: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323266987000027>
74. GUNATILLAKE, P.A. et al. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*. 2003, 5, 1–16. [žiūrēta 2022-02-21]. ISSN 14732262. Prieiga per -doi: 10.22203/eCM.v005a01

75. NIAOUNAKIS, M. Building and Construction Applications. *Biopolymers: Applications and Trends*. 2015, 445–505. [žiūrēta 2022-02-21]. ISBN 9780323354332. Prieiga per doi: 10.1016/b978-0-323-35399-1.00010-7
76. MOUSER, V.H.M. et al. Three-Dimensional Bioprinting and Its Potential in the Field of Articular Cartilage Regeneration. *Cartilage*. 2017, 8 (4), 327–340, [žiūrēta 2022-02-27]. ISSN 19476043. Prieiga per doi: 10.1177/1947603516665445
77. TAMAY, D.G. et al. 3D and 4D printing of polymers for tissue engineering applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019, 7, 1–22. [žiūrēta 2022-02-21]. ISSN 22964185. Prieiga per doi: 10.3389/fbioe.2019.00164
78. DO, A.V. et al. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Advanced Healthcare Materials*. 2015, 4 (12), 1742–1762. [žiūrēta 2022-02-27]. ISSN 21922659. Prieiga per doi: 10.1002/adhm.201500168
79. KONTA, A.A. et al. Personalised 3D printed medicines: Which techniques and polymers are more successful? *Bioengineering*. 2017, 4 (4), 1–16. [žiūrēta 2022-02-27]. ISSN 23065354. Prieiga per doi: 10.3390/bioengineering4040079
80. ZASZCZYŃSKA, A. et al. Advances in 3D printing for tissue engineering. *Materials*, 2021, 14 (12), 1–28. [žiūrēta 2022-02-21]. ISSN 19961944. Prieiga per doi: 10.3390/ma14123149
81. HACIOGLU, A. et al. 3D Printing for Tissue Engineering Applications. *Journal of Polytechnic*. 2018, 21 (1), 221–227. [žiūrēta 2022-04-18]. ISSN 1302-0900. Prieiga per doi: 10.2339/politeknik.389596
82. BEKE, S. et al. 3D scaffold fabrication by mask projection excimer laser stereolithography. *Optical Materials Express*. 2014, 4 (10), 20–32. [žiūrēta 2022-04-18]. ISSN 21593930. Prieiga per doi: 10.1364/ome.4.002032
83. SKOOG, S.A. et al. Stereolithography in tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014, 25 (3), 845–856. [žiūrēta 2022-02-25]. ISSN 15734838. Prieiga per doi: 10.1007/s10856-013-5107-y
84. HUANG, J. et al. A review of stereolithography: Processes and systems. *Processes*. 2020, 8 (9), 1–16. [žiūrēta 2022-05-05]. ISSN 22279717. Prieiga per doi: 10.3390/PR8091138
85. MELCHELS, F.P.W. et al. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010, 31 (24), 6121–6130. [žiūrēta 2022-02-21]. ISSN 01429612. Prieiga per doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.050
86. XIE, Z. et al. 3D bioprinting in tissue engineering for medical applications: The classic and the hybrid. *Polymers*. 2020, 12 (8), 1–27 [žiūrēta 2022-04-15]. ISSN 20734360. Prieiga per doi: 10.3390/POLYM12081717
87. RIDER, P. et al. Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*. 2018, 9, 1–16. [žiūrēta 2022-05-05]. ISSN 20417314. Prieiga per doi: 10.1177/2041731418802090
88. RAMADAN, Q., ZOUROB, M. 3D Bioprinting at the Frontier of Regenerative Medicine, Pharmaceutical, and Food Industries. *Frontiers in Medical Technology*. 2021, 2, 1–19. [žiūrēta 2022-05-05]. ISSN 2673-3129. Prieiga per doi: 10.3389/fmedt.2020.607648
89. UDOMLUCK, N. et al. Recent developments in nanofiber fabrication and modification for bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21 (1), 1–16. [žiūrēta 2022-05-14]. ISSN 14220067. Prieiga per doi: 10.3390/ijms21010099
90. AVÉROUS, L. Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. 2008, 433–450 [žiūrēta 2022-05-05]. ISBN 9780080560519. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-08-045316-3.00021-1

91. ROLLY GONZALES, R. et al. Modification of Nanofiber Support Layer for Thin Film Composite Forward Osmosis Membranes via Layer-By-Layer Polyelectrolyte Deposition Environmental risk assessment of nanomaterials for soil and groundwater remediation View project Phosphorous and Nitrogen recovery from human urine via fertiliser driven forward osmosis. [interaktyvus]. 2018, 1–24 [žiūrėta 2022-05-14]. Prieiga per doi: 10.20944/preprints201807.0279.v1
92. LIANG, F. et al. Near-field melt electrospinning of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) micro-line array for cell alignment study. In *Materials Research Express*. 2019, 6 (1), 1–11. [žiūrėta 2022-05–11]. ISSN 20531591. Prieiga per doi: 10.1088/2053-1591/aae6f3
93. BROWN, T.D. et al. Direct writing by way of melt electrospinning. *Advanced Materials*. 2011, 23 (47), 5651–5657. [žiūrėta 2022-05–10]. ISSN 09359648. Prieiga per doi: 10.1002/adma.201103482
94. BHARDWAJ, N., KUNDU, S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010, 28 (3), 325–347. [žiūrėta 2022-05–05]. ISSN 07349750. Prieiga per doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
95. HUTMACHER, D.W., DALTON, P.D. Melt electrospinning. *Chemistry - An Asian Journal*. 2011, 6 (1), 44–56. [žiūrėta 2022-05–12]. ISSN 18614728. Prieiga per doi: 10.1002/asia.201000436
96. WUNNER, F.M. et al. Melt electrospinning writing of three-dimensional poly(ϵ -caprolactone) scaffolds with controllable morphologies for tissue engineering applications. *Journal of Visualized Experiments*. 2017, 130, 1–12. [žiūrėta 2022-05–05]. ISSN 1940087X. Prieiga per doi: 10.3791/56289
97. FUCHS, A. et al. Medical-grade polycaprolactone scaffolds made by melt electrospinning writing for oral bone regeneration - A pilot study in vitro. *BMC Oral Health*. 2019, 19 (1), 1–11. [žiūrėta 2022-05–10]. ISSN 14726831. Prieiga per doi: 10.1186/s12903-019-0717-5
98. ZAISS, S. et al. Poly(ϵ -caprolactone) scaffolds fabricated by melt electrospinning for bone tissue engineering. *Materials*. 2016, 9 (4), 1–15, [žiūrėta 2022-02-27]. ISSN 19961944. Prieiga per doi: 10.3390/ma9040232
99. VISSER, J. et al. Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibres. *Nat Commun*. 2015; 6 (1), 1–10. [žiūrėta 2022-05–20]. ISSN2041-1723 . Prieiga per doi: 10.1038/ncomms7933
100. BROWN, T.D. et al. Design and fabrication of tubular scaffolds via direct writing in a melt electrospinning mode. *Biointerphases*. 2012, 7, 1–16. [žiūrėta 2022-05-12]. ISSN 09359648. Prieiga per doi: 10.1002/adma.201103482
101. FARRUGIA, B.L. et al. Dermal fibroblast infiltration of poly(ϵ -caprolactone) scaffolds fabricated by melt electrospinning in a direct writing mode. *Biofabrication*. 2013, 5 (2), 1–11. [žiūrėta 2022-02-25]. ISSN 17585082. Prieiga per doi: 10.1088/1758-5082/5/2/025001
102. DOUSTGANI, A., AHMADI, E. Melt electrospinning process optimization of polylactic acid nanofibers. *Journal of Industrial Textiles*. 2015, 45, 1–9. [žiūrėta 2022-05–12]. ISSN 1528-0837. Prieiga per doi: 10.1177/1528083715610297
103. YU, S.X. et al. Morphology control of PLA microfibers and spheres via melt electrospinning. *Materials Research Express*. 2018, 5 (4), 1–15. [žiūrėta 2022-05–18]. ISSN 09574530. Prieiga per doi: 10.1007/s10856-012-4695-2
104. LEE, H. et al. Fabrication, characterization, and in vitro biological activities of melt-electrospun PLA micro/nanofibers for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013, 1 (30), 3670–3677. [žiūrėta 2022-05–17]. ISSN 20507518. Prieiga per doi: 10.1039/c3tb20424c

105. KUMBAR, S.G. et al. Electrospun nanofiber scaffolds: Engineering soft tissues. *Biomedical Materials*. 2008, 3 (3), 1–15. [žiūrėta 2022-05–18]. ISSN 01429612. Prieiga per doi: 10.1016/S0142-9612(03)00383-1
106. VERBEEK, C.J.R., BERG, L.E. Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2010, 295 (1), 10–21. [žiūrėta 2022-05–12]. ISSN 01429612. Prieiga per doi: 10.1016/S0142-9612(03)00383-1
107. HILL, R.G. Polymers. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*. 2005, 37–47. ISBN 9781855737372. [žiūrėta 2022-05–12]. Prieiga per doi: 10.1533/9781845690861.1.37
108. MAKUŠKA, R. *Polimerų tyrimo metodai*. Vilnius: TEV. 2012, 1–308. [žiūrėta 2022-05–12]. ISBN 978-609-433-148-0.
109. KORCHINSKI, D. et al. A Brief Introduction to Scanning Electron Microscopy. 2019, 1, 1–13. [žiūrėta 2022-05–12].
110. SPIEGELBERG, S. KOZAK, A. et al. UHMWPE Biomaterials Handbook. 3-oji laida. *Characterization of Physical, Chemical, and Mechanical Properties of UHMWPE*. 2016, 531–552. [žiūrėta 2022-05–12]. ISSN 01429612. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-323-35401-1/00029-6
111. KORCHINSKI, D. et al. A Brief Introduction to Scanning Electron Microscopy [interaktyvus]. [žiūrėta 2022-05–12]. Prieiga per internetą: <https://www.scimed.co.uk/education/sem-scanning-electron-microscopy/>
112. FTIR Spectroscopy - Theory and Fundamentals | JASCO. [interaktyvus]. [žiūrėta 2022-04-24]. Prieiga per internetą: <https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/fundamentals-ftir-spectroscopy/>
113. NIAOUNAKIS, M. Building and Construction Applications. *Biopolymers: Applications and Trends*. 2015, 445–505. [žiūrėta 2022-02-21]. ISBN 9780323354332. Prieiga per doi: 10.1016/b978-0-323-35399-1.00010-7
114. JANG, J. et al. Characterization of Agar for Soil Remediation. *J. Korean Soc. Hazard Mitig* [interaktyvus]. 2017, 17 (6), 351–358. [žiūrėta 2022-04-24]. ISSN 2287-6723. Prieiga per doi: 10.9798/KOSHAM.2017.17.6.351
115. WANG, X.F., HUANG, Z.M. Melt-electrospinning of PMMA. *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*. 2010, 28 (1), 45–53. [žiūrėta 2022-05–12]. ISSN 02567679. Prieiga per doi: 10.1007/s10118-010-8208-9
116. WATANABE, K. et al. Development of polypropylene nanofiber production system. *Polymer Reviews*. 2011, 51 (3), 288–308. [žiūrėta 2022-05–12]. ISSN 15583724. Prieiga per doi: 10.1080/15583724.2011.594195
117. YANG, Y. et al. Effect of electric field distribution uniformity on electrospinning. *Journal of Applied Physics*. 2008, 103 (10), 1–11. [žiūrėta 2022-05–12]. ISSN 00218979. Prieiga per doi: 10.1063/1.2924439
118. CHIENG, B.W. et al. Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites: Effects of graphene nanoplatelets. *Polymers*. 2014, 6 (1), 93–104. [žiūrėta 2022-05–12]. ISSN 20734360. Prieiga per doi: 10.3390/polym6010093
119. CHI, H.Y. et al. Fabrication of polylactic acid/paclitaxel nano fibers by electrospinning for cancer therapeutics. *BMC Chemistry*. 2020, 14 (1), 1–12. [žiūrėta 2022-04-01]. ISSN 2661801X. Prieiga per doi: 10.1186/s13065-020-00711-4
120. SHALUMON, K.T. et al. Hierarchically designed electrospun tubular scaffolds for cardiovascular applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2011, 7 (5), 609–620. [žiūrėta 2022-05–12]. ISSN 15507033. Prieiga per doi: 10.1166/jbn.2011.1337

121. KAMARUDIN, S.H. et al. A study of mechanical and morphological properties of PLA based biocomposites prepared with EJO vegetable oil based plasticiser and kenaf fibres. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2018, 1, 1–12. [žiūrēta 2022-05–12]. ISSN 1757899X. Prieiga per doi: 10.1088/1757-899X/368/1/012011
122. POPA, E.E. et al. Polylactic acid/cellulose fibres based composites for food packaging applications. *Materiale Plastice*. 2017, 54 (4), 673–677. [žiūrēta 2022-05–12]. ISSN 00255289. Prieiga per doi: 10.37358/mp.17.4.4923
123. YANG, Z. et al. Morphological, Mechanical and Thermal Properties of Poly(lactic acid) (PLA)/Cellulose Nanofibrils (CNF) Composites Nanofiber for Tissue Engineering. *Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition*. 2019, 34 (1), 207–215. [žiūrēta 2022-05–20]. ISSN 19930437. Prieiga per doi: 10.1007/s11595-019-2037-7
124. WANG, N. et al. Influence of carbon black on the properties of plasticized poly(lactic acid) composites. *Polymer Degradation and Stability*. 2008, 93 (6), 1044–1052. [žiūrēta 2022-05–12]. ISSN 01413910. Prieiga per doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.03.023
125. HEJNA, A. et al. Reclaimed rubber/poly(ε-caprolactone) Blends: Structure, mechanical, and thermal properties. *Polymers*. 2020, 12 (5), 1–18. [žiūrēta 2022-05–12]. ISSN 20734360. Prieiga per doi: 10.3390/POLYM12051204
126. BUTT, H.-J. et al. *Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology. 5-oji laida.* [interaktyvus]. ISBN 978-3-527-30658-9. [žiūrēta 2022-05–12]
127. CHONG, L.H. et al. Wettability and water uptake properties of pla and pcl/gelatin-based electrospun scaffolds. [interaktyvus]. 2016. [žiūrēta 2022-05–12] ISSN 1819-6608 Prieiga per internetą: www.arpnjournals.com
128. LIU, L., YUAN, W. A hierarchical functionalized biodegradable PLA electrospun nanofibrous membrane with superhydrophobicity and antibacterial properties for oil/water separation. *New Journal of Chemistry*. 2018, 42 (21), 17615–17624. [žiūrēta 2022-05-09]. ISSN 13699261. Prieiga per doi: 10.1039/C8NJ03112F
129. PAVLOVA, E.R. et al. Tuning the properties of electrospun polylactide mats by ethanol treatment. *Materials and Design*. 2019, 181, 1–8. [žiūrēta 2022-05–14]. ISSN 18734197. Prieiga per doi: 10.1016/j.matdes.2019.108061
130. PRAVEENA, N.M. et al. Infrared bands to distinguish amorphous, meso and crystalline phases of poly(lactide)s: Crystallization and phase transition pathways of amorphous, meso and co-crystal phases of poly(L-lactide) in the heating process. *Polymer*. 2022, 240, 1–10. [žiūrēta 2022-04-15]. ISSN 0032-3861. Prieiga per doi: 10.1016/J.POLYMER.2021.124495
131. KIM, G. et al. Coaxial structured collagen-alginate scaffolds: Fabrication, physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry*. 2011, 21 (17), 6165–6172. [žiūrēta 2022-05–02]. ISSN 09599428. Prieiga per doi: 10.1039/c0jm03452e
132. LI, W. et al. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002, 60(4), 613–21. [žiūrēta 2022-05–06]. ISSN 1552-4965. Prieiga per doi: 10.1002/jbm.10167
133. MO, Y. et al. Preparation and properties of PLGA nanofiber membranes reinforced with cellulose nanocrystals. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015, 132, 177–184. [žiūrēta 2022-05–12]. ISSN 18734367. Prieiga per doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.05.029
134. EDWARDS, C., MARKS, R. Evaluation of Biomechanical Properties of Human Skin. *Clinics in Dermatology*. 1995, 13 (4), 375–80. [žiūrēta 2022-05–12]. ISSN 0738-081X. Prieiga per doi: 10.1016/0738-081x(95)00078-t