



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Dalia Mintaučytė

KARKASAI MINKŠTŪJŲ AUDINIŲ REGENERACIJAI

Baigiamasis magistro projektas

Vadovė

Dr. Odeta Baniukaitienė

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

KARKASAI MINKŠTŲJŲ AUDINIŲ REGENERACIJAI

Baigiamasis magistro projektas

Taikomoji chemija (kodas 621F10003)

Vadovė

Dr. Odeta Baniukaitienė

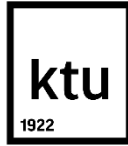
Recenzentas

Dr. Edvinas Krugly

Projektą atliko

Dalia Mintaučkytė

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Dalia Mintaučkytė

Studijų programa Taikomoji chemija (kodas 621F10003)

„Karkasai minkštųjų audinių regeneracijai“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2018 m. _____ mėn. __ d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Dalios Mintaučkytės**, baigiamasis projektas tema „Karkasai minkštųjų audinių regeneracijai“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena darbo dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymu nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	6
SUMMARY	7
SANTRUMPOS	8
IŽANGA.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Medžiagos karkasams formuoti	10
1.1.1. Sintetiniai polimerai	10
1.1.2. Gamtiniai polimerai	11
1.2. Triblokiniai kopolimerai aktyviųjų junginių pernašai	17
1.3. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir projekto tikslo pagrindimas	20
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI.....	21
2.1. Naudotos medžiagos	21
2.2. Natrio hialuronato tinklinimas	22
2.3. Infraraudonųjų spindulių molekulinė absorbcinė spektrinė analizė	23
2.4. Skenuojančioji elektroninė mikroskopija	23
2.5. Skysčių sorbcija	23
2.6. Drėgmės kiekio nustatymas	23
2.7. Karkasų akytumas	24
2.8. Joduoto povidono imobilizavimas karkasuose ir jodo atsipalaidavimo tyrimai	24
2.9. Chlorheksidino digliukonato imobilizavimas ir jo atsipalaidavimo iš karkasų tyrimai	24
2.10. Antibakterinių savybių tyrimas.....	25
2.11. Tinklintos hialurono rūgšties aktyvų granulių su triblokiniu kopolimeru paruošimas	26
2.12. Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija	26
2.13. Tinklintos hialurono rūgšties aktyvų granulių su triblokiniu kopolimeru ir imobilizuotu fibroblastų augimo faktoriumi paruošimas	27
2.14. Fibroblastų augimo faktoriaus atsipalaidavimo kinetika	27
2.15. Statistinė duomenų analizė	29
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	30
3.1. Tinklintos hialurono rūgšties aktyvų granulių ir bloko pavidalo karkasų gavimas	30
3.2. Aktyviųjų junginių imobilizavimas karkasuose.....	33
3.2.1. Tinklintos hialurono rūgšties karkasai su imobilizuotu joduotu povidonu	34
3.2.1.1. Jodo atsipalaidavimo kinetika	36

3.2.2. Tinklintos hialurono rūgšties karkasai su imobilizuotu chlorheksidino digliukonatu .	37
3.2.2.1. Chlorheksidino digliukonato atsipalaidavimo iš karkasų kinetika	38
3.2.2.2 Antibakterinės karkasų savybės	39
3.2.3. Tinklintos hialurono rūgšties su inkliuduotu triblokiniu kopolimero tirpalu savybių tyrimai	40
3.2.3.1. Hialurono rūgšties granulės su triblokiniu kopolimeru ir fibroblastų augimo faktoriumi	42
3.2.3.2. Fibroblastų augimo faktoriaus atsipalaidavimo kinetika	42
IŠVADOS.....	46
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	47
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	52

Mintaučkytė, Dalia. Karkasai minkštųjų audinių regeneracijai. Magistro baigiamasis projektas / vadovė dr. Odeta Baniukaitienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Polimerų chemijos ir technologijos katedra.

Mokslų kryptis ir sritis: fiziniai mokslai, chemija.

Reikšminiai žodžiai: *karkasai, hialurono rūgštis*.

Kaunas, 2018. 52 p.

SANTRAUKA

Pastaruoju metu audinių inžinerijoje didelis dėmesys yra skiriamas polimerinių karkasų, skirtų minkštųjų audinių regeneracijai, kūrimui. Karkasai formuojami iš sintetinių ar gamtinių polimerų su imobilizuotais aktyviais junginiais, kurie pasižymi antibakterinėmis, antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis ar audinių regeneraciją skatinančiomis savybėmis.

Šiame darbe karkasams gauti buvo naudojama hialurono rūgštis. Fiziologiniuose skysčiuose netirpus gelis buvo gautas tinklinant polimerą 1,4-butandiolio diglicidilo eteriu. Aktyvių granulių ir bloko pavidalo karkasai suformuoti liofilizacijos būdu. Karkasuose imobilizuoti aktyvieji junginiai, pasižymintys antibakterinėmis, priešuždegiminėmis ir audinių regeneraciją skatinančiomis savybėmis. Nustatyta, kad į bloko pavidalo karkasus imobilizavus joduotą povidoną, chlorheksidino digliukonata, gaunamos antibakterinių junginių pailginto atsipalaidavimo sistemos. Ištirta, kad karkasai su imobilizuotu chlorheksidino digliukonatu pasižymi antibakteriniu aktyvumu prieš *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ir *Pseudomonas aeruginosa* bakterijas. Inhibicinės zonos skersmuo sumažėja karkasus inkliudavus mažos molekulinės masės hialurono rūgšties tirpalu. Nustatyta, kad iš hialurono rūgšties granulių, inkliuduotų triblokio kopolimero tirpalu, pailgėja fibroblastų augimo faktoriaus atsipalaidavimas.

Mintaučkytė, Dalia. *Scaffolds for Soft Tissue Regeneration: Master's thesis in Applied Chemistry / supervisor dr. Odeta Baniukaitienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Research area in: Physical Sciences, Chemistry.

Key words: *scaffolds, hyaluronic acid.*

Kaunas, 2018. 52 p.

SUMMARY

Currently, in the field of tissue engineering, much attention has been directed towards creation of polymeric scaffolds to aid tissue regeneration. The scaffolds have been constructed from both natural and synthetic polymers and immobilizing on them various compounds with antibacterial, antioxidant, and tissue regeneration-stimulating properties.

In this work hyaluronic acid gel was prepared by cross-linking polymer using 1,4-butanediol diglycidyl ether. The gel blocks and granules were made and lyophilized in order to create porous structures. Active compounds possessing antibacterial, antiinflammatory, and tissue regeneration-stimulating properties were immobilized in the scaffolds. It was determined that when povidone iodine or chlorhexidine digluconate were immobilized in the block-shaped scaffolds, slow antibacterial substance release systems were created. The scaffolds with immobilized chlorhexidine digluconate exhibited antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. Diameter of the bacterial growth inhibition area was reduced when low-molecular weight hyaluronic acid was added to the scaffolds. *In vitro* release kinetics of fibroblast growth factor from hyaluronic acid granules revealed a slow, sustained release, with a cumulative release of 32 % of the initial growth factor from the granules which included triblock copolymer.

SANTRUMPOS

CHA – chlorheksidino acetatas

CHD – chlorheksidino digliukonatas

FGF – fibroblastų augimo faktorius

ELISA – imunofermetinė analizė

HEC – hidroksietilceliuliozė

HR – hialurono rūgštis

HR_D – didelės molekulinės masės hialurono rūgštis

HR_M – mažos molekulinės masės hialurono rūgštis

JP – joduotas povidonas

PEO-*b*-PPO-*b*-PEO – poli(etilenoksidai)-*blok*-poli(propilenoksidai)-*blok*-
poli(etilenoksidai)

PGA – poli(glikolio rūgštis)

PLA – poli(pieno rūgštis)

PLGA – poli(laktido-*ko*-glikolidai)

PVP – polivinilpirolidonai

t-HR – tinklinta hialurono rūgštis

IŽANGA

Pasaulyje intensyviai kuriami polimeriniai geliai, plėvelės, granulių ar bloko pavidalo karkasai, skirti žaizdoms gydyti. Jų gavimui naudojami tiek sintetiniai, tiek gamtiniai polimerai, kurie yra netoksiški, neimunogeniški, pasižymi suderinamumu su biologinėmis sistemomis bei kontroliuojama bioskaida. Siekiant išvengti uždegimų ar paskatinti ląstelių sukibimą, jų dauginimąsi, plitimą ir diferenciaciją, dažnai į biomedžiagas yra imobilizuojami aktyvieji junginiai, kurie pasižymi antibakterinėmis, antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis ar audinių regeneraciją skatinančiomis savybėmis. Aktyviųjų junginių pernašai į žaizdą dažnai naudojami kopolimerai, kuriems būdingas zolio-gelio virsmas.

Didelę perspektyvą šioje srityje turi hialurono rūgštis (HR). Jos stimuliuojantis poveikis audinių regeneracijai plačiai ištirtas. HR naudojama įvairiose srityse: oftalmologijoje ragenos drėkinimui, minkštųjų audinių korekcijai ir regeneracijai, injekcijoms į sąnario ertmę, kaulo audinio regeneracijai.

Šio projekto tikslas – suformuoti tinklintos hialurono rūgšties karkasus, skirtus minkštųjų audinių regeneracijai.

Projekto uždaviniai:

- suformuoti hialurono rūgšties granulių ir bloko pavidalo karkasus ir ištirti jų morfologiją, skysčių sorbciją;
- suformuoti hialurono rūgšties karkasus su joduotu povidonu ir ištirti jodo atsipalaidavimo kinetiką;
- suformuoti hialurono rūgšties karkasus su chlorheksidino digliukonatu ir ištirti jo atsipalaidavimo kinetiką, karkasų antibakterinį aktyvumą;
- suformuoti hialurono rūgšties karkasus su fibroblastų augimo faktoriumi ir ištirti triblokio kopolimero įtaką augimo faktoriaus atsipalaidavimo kinetikai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

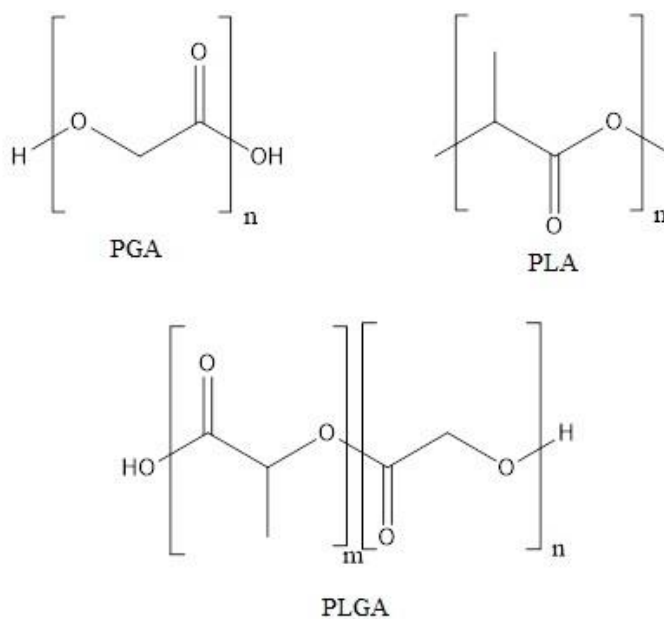
1.1. Medžiagos karkasams formuoti

Pasaulyje intensyviai tiriami polimeriniai geliai, plėvelės, granuliu ar bloko pavidalo karkasai, skirti žaizdoms gydyti [1–3]. Jiems gauti naudojami tiek sintetiniai, tiek gamtiniai polimerai. Aktyvų struktūrų formavimui naudojamos įvairios technologijos: kietų dalelių įterpimas ir išplovimas, veikimas superkritiniais skysčiais, liofilizacija, elektrinis verpimas, lydžios masės formavimas ir kt. [4–6].

Dažnai į suformuotas biomedžiagas yra imobilizuojami įvairūs aktyvieji junginiai, kurie pasižymi antibakterinėmis, antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis ar audinių regeneraciją skatinančiomis savybėmis [7–9].

1.1.1. Sintetiniai polimerai

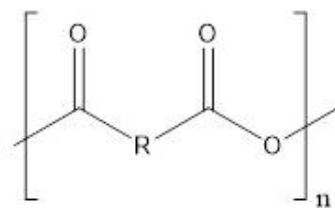
Karkasams, skirtiems pažeisto audinio regeneracijai, formuoti yra naudojami bioskaidūs sintetiniai polimerai, tokie kaip poli(glikolio rūgštis) (PGA), poli(pieno rūgštis) (PLA) ir poli(laktido-*ko*-glikolidas) (PLGA) (žr. 1.1 pav.).



1.1 pav. PGA, PLA, PLGA cheminės struktūros

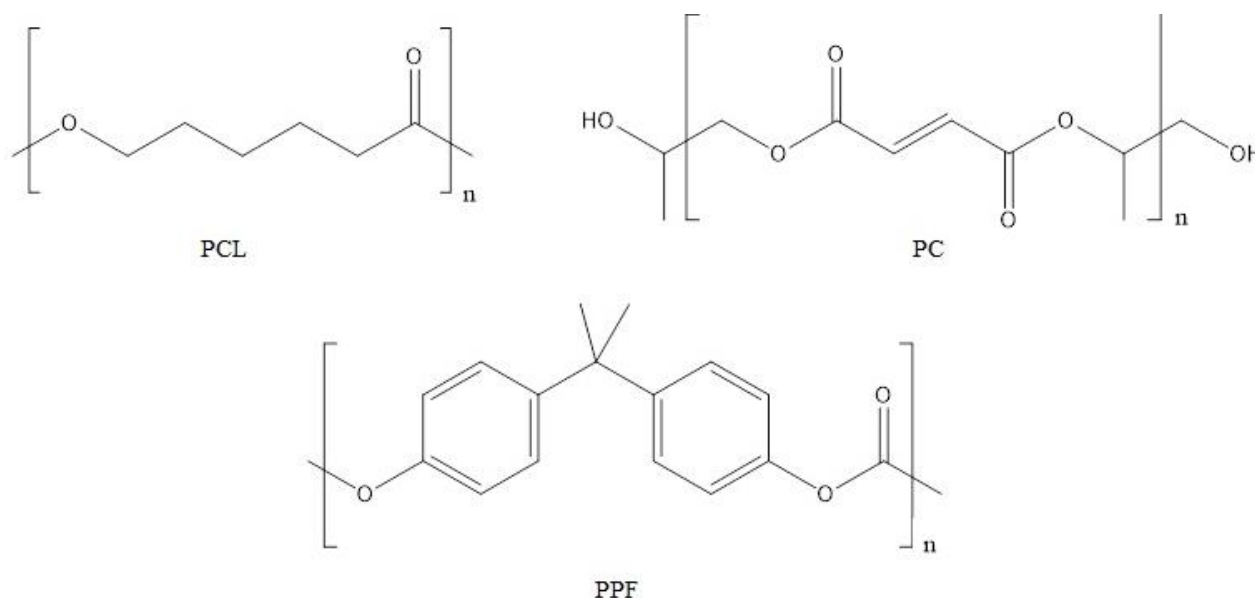
Šių polimerų ribotas naudojimas yra susijęs su jų skilimo produktais. Esant didelėms skilimo produktų koncentracijoms, gali padidėti vietinis rūgštingumas, galintis sukelti audinių nekrozę [10].

Karkasams formuoti naudojami ir polianhidridai (žr. 1.2 pav.), kurie pasižymi suderinamumu su biologinėmis sistemomis ir kontroliuojama bioskaida.



1.2 Bendroji polianhidridų cheminė struktūra

Tačiau audinių inžinerijoje vien šios klasės polimerus kol kas galima taikyti tik minimaliai, nes jų mechaninės savybės nėra pakankamai geros [11]. Kiti bioskaidūs sintetiniai polimerai, pavyzdžiui, poli(ϵ -kaprolaktonas) (PCL), polikarbonatai (PC) ir polifumaratai (pvz., polipropileno fumaratas) (PPF) (žr. 1.3 pav.), dėl savo mechaninių savybių ir ilgai trunkančio bioskaidos proceso dažniausiai naudojami kaulo audinio inžinerijoje.

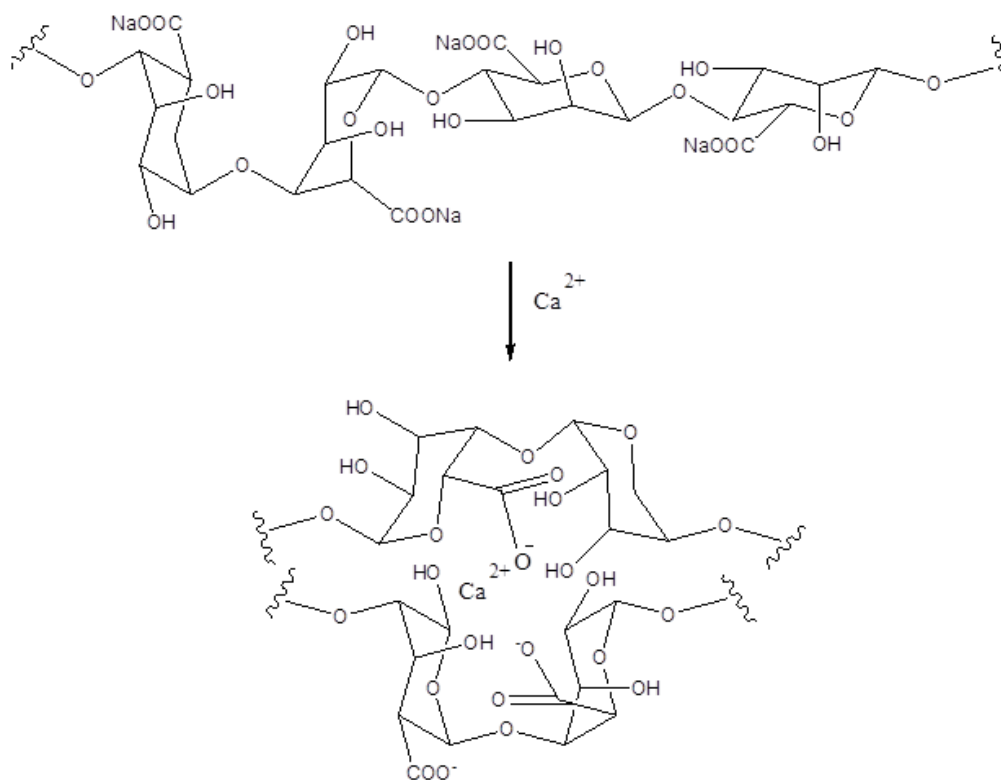


1.3 pav. PCL, PC, PPF cheminės struktūros

Karkasams, skirtiems minkštųjų audinių regeneracijai, šie polimerai naudojami rečiau, dažnai jie derinami su gamtinės kilmės polimerais [12].

1.1.2. Gamtiniai polimerai

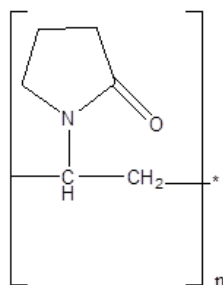
Natrio alginatas yra alginato rūgšties druska. Algino rūgštis – tai α -(1-4) ryšiais sujungtų *L*-gulurono rūgšties (G) ir β -(1-4) ryšiais sujungtų *D*-manurono rūgšties (M) likučių blokinis kopolimeras [13]. Natrio alginatas, sąveikaudamas su divalenčiais katijonais, pavyzdžiui, kalcio jonais, suformuoja vandenyje netirpų gelį (žr. 1.4 pav.). Dėl šios savybės natrio alginatas plačiai naudojamas audinių inžinerijoje [14].



1.4 pav. Natrio alginato tinklinimo reakcijos schema

Alginatiniai pluoštai, kaip hemostatinė priemonė, yra plačiai naudojami kraujuojančioms žaizdoms gydyti [15]. Jie pasižymi puikiais skysčius sugeriančiomis, taip pat gelifikuojančiomis, kartu ir drėkinančiomis savybėmis [16].

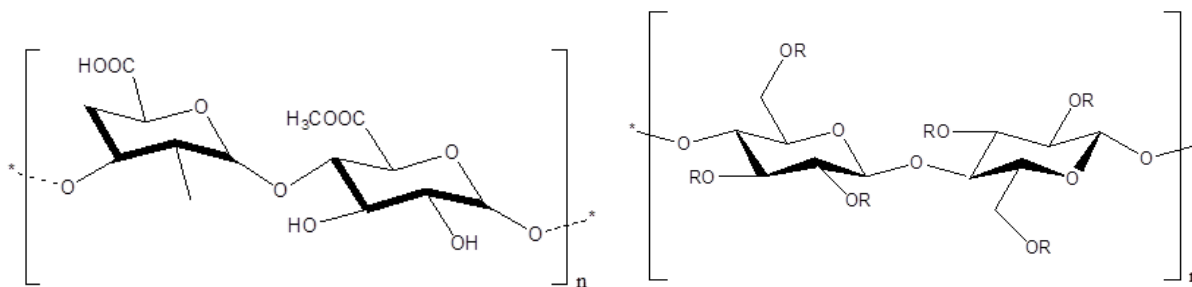
Dažnai žaizdų gijimui paskatinti yra naudojami įvairūs aktyvieji junginiai, iš kurių plačiausiai yra naudojamas joduotas povidonas (JP) (žr. 1.5 pav.). Tai iš polivinilpirolidono (PVP) ir jodo sudarytas kompleksinis junginys, iš kurio jodas yra lėtai atpalaiduojamas. Šis kompleksas yra plataus antibakterinio spektro, įskaitant periodonto sukėlėjus, mikobakterijas bei virusus, antiseptikas [17].



1.5 pav. Joduoto povidono cheminė struktūra

KTU Polimerų chemijos ir technologijos katedroje buvo pagaminti polimeriniai karkasai su imobilizuotu JP minkštųjų audinių regeneracijai [18]. Karkasai buvo formuojami iš vandenyje

tirpių polimerų: natrio alginato (žr. 1.4 pav.), pektino (žr. 1.6 pav.) ir mažesnės bei didesnės molekulinės masės hidroksietilceliuliozės (HEC) (žr. 1.7 pav.).



1.6 pav. Pektino cheminė struktūra

1.7 pav. HEC cheminė struktūra, R=H, CH₂CH₂OH

Polimerų kiekių santykiai mišinyje atitinkamai buvo 1:2:2, 2:1:2 ir 2:2:1. Akyti karkasai buvo formuojami liofilizacijos būdu ir tinklinant polimerą kalcio jonais.

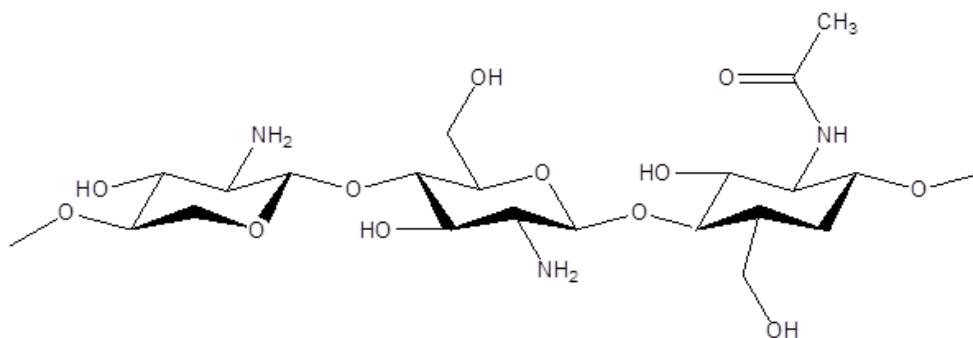
Tyrimų metu buvo nustatyta, kad JP turi įtakos karkasų morfologijai. Mažiausią įtaką turėjo karkasams, kurie buvo gauti sumaišant polimerus santykiu 2:2:1, naudojant mažesnės molekulinės masės HEC. Šių mėginių akučių forma ir dydis pasikeitė nežymiai. Mėginių su didesnės molekulinės masės HEC akučių dydis sumažėjo ir jos tapo plokštesnės formos.

Jodo atpalaidavimo kinetikos tyrimai parodė, kad jodas greičiausiai atsipalaidavo iš karkasų, kuriuose polimerų santykis buvo 2:1:2. Lėčiausiai jodas atsipalaidavo iš karkasų, kuriuose polimerų santykis 2:2:1.

Liakosas (*Liakos I.*) su bendradarbiais [7] pagamino aktytas granules iš kalcio alginato su imobilizuotu JP. Mokslininkai nustatė, kad naudojant kalcio alginato granules galima pailginti antiseptiko atsipalaidavimą ir išlaikyti reikiamą jo koncentraciją žaizdos vietoje. Visiškas jodo atsipalaidavimas iš kalcio alginato granuliu buvo pasiektas praėjus daugiau nei 3 val. Tyrimais *in vitro* buvo parodyta, kad kalcio alginato granulės su JP pasižymi antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* bakterijas ir priešgrybeliniu poveikiu *Candida albicans* grybeliui.

Chitozanas – tai linijinės struktūros polimeras, sudarytas iš 75–95 % gliukozamino ir 5–25 % *N*-acetil-*D*-gliukozamino vienetų, sujungtų β-1,4-glikozidiniais ryšiais (žr. 1.8 pav.) [19].

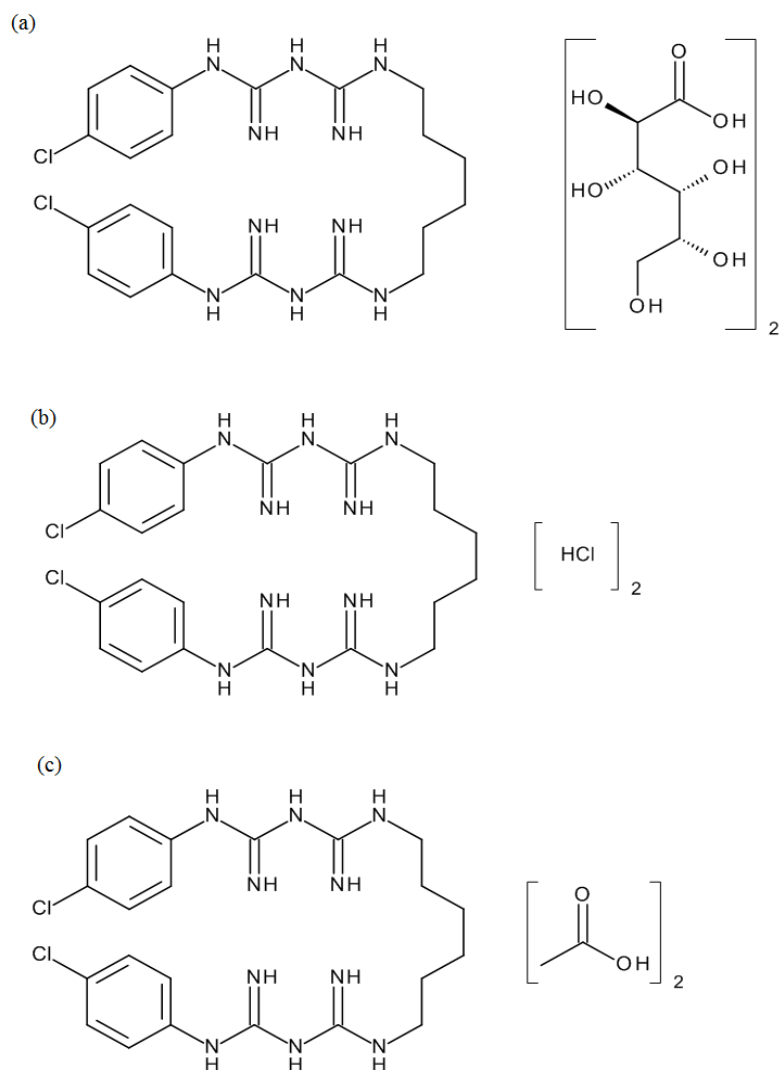
Netirpūs chitozono geliai gali būti gaunami fiziniais skersiniais ryšiais sujungiant jį su priešingo ženklo krūvį turinčiais polimerais, pavyzdžiui, alginatu. Chitozono geliai taip pat gali būti formuojami sudarant skersinius kovalentinius ryšius [20]. Kovalentinių ryšių susidarymui į chitozaną įvedamos papildomos funkcinės grupės ar įskiepijami sintetiniai polimerai: poli(etilenoglikolis), poliuretanai ir kt. Modifikavimas atliekamas per chitozono hidroksi- ar aminogrupes [21].



1.8 pav. Chitozano cheminės struktūros fragmentas

Pastaruoju metu didelis dėmesys skiriamas kuriant preparatus burnos ertmės ligoms gydyti, kurie pailgintų imobilizuotų aktyviųjų junginių terapinį vietinį poveikį, apsaugotų vaistą nuo skilimo dėl nepalankios biologinės aplinkos [9]. Šioje srityje didelę perspektyvą turi chitozanas [22]. Jo geliai pasižymi suderinamumu su biologinėmis sistemomis, bioskaidumu, netoksiškumu. Jis ypač vertinamas dėl mukoadhezinių savybių [23]. Be to, jis stabdo mieliagybių, tokių kaip *Candida albicans*, plitimą [22].

Dažniausiai burnos ertmės ligoms gydyti pasirenkamas chlorheksidinas [9]. Tai katijoninis biguanidas, plataus spektro antimikrobinė medžiaga, dažniausiai naudojamas digliukonato, dihidrochlorido ir diacetato formų (žr. 1.9 pav.) [24, 25].



1.9 pav. Cheminės struktūros: a) chlorheksidino digliukonato, b) chlorheksidino dihidrochlorido, c) chlorheksidino diacetato

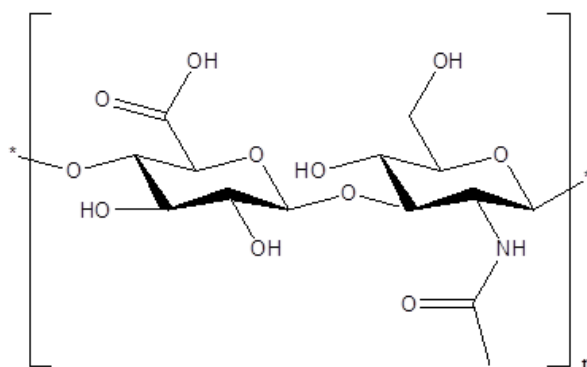
Chitozanas, priešingai nei celiuliozės dariniai, natrio alginatas ir kt., komplekso su CHD nesudaro, taip užtikrinant antimikrobinį aktyvumą [9].

Senelas (*Senel S.*) ir kt. [22] pagamino chitozано gelius ir plėveles, tinklinant polimerą natrio tripolifosfatu. Gelius ir plėveles (polimero koncentracija 1 % ar 2 %) inkludavo 0,1 % ar 0,2 % koncentracijų CHD tirpalais. Mokslininkai nustatė, kad chitozано koncentracija CHD atsipalaidavimui iš gelių ar plėvelių įtakos neturi, CHD visiškai atsipalaidavo per 3–4 val. Buvo nustatyta, kad tiek geliai, tiek plėvelės pasižymi antimikrobinu aktyvumu prieš *Candida albicans* mieliagrybius. Didinant chitozано koncentraciją antimikrobinis aktyvumas didėjo.

Rata (*Rata D. M.*) ir kt. [26] taip pat naudojo chitozaną plėvelėms su pektinu formuoti. Chitozано masės dalis plėvelėse buvo 0,15 %, o pektino kiekis kito nuo 0,125 % iki 0,15 %. Plėveles inkludavo 10 mg/ml koncentracijos CHD tirpalu. Mokslininkai nustatė, kad CHD

atsipalaidavimo kinetika iš plėvelių priklauso nuo jų sudėties. Didinant pektino koncentraciją, CHD iš plėvelių atsipalaidavimas vyko greičiau. Išsiskyrusio CHD kiekis po 6 val. siekė 53 %, kai pektino ir chitozono santykis plėvelėse buvo 1:1. Esant didžiausiai pektino koncentracijai plėvelėse, išsiskyrusio CHD kiekis po 6 val. siekė 75 %.

HR – didelės molekulinės masės anijoninis nesulfatinis gliukozaminoglikanas, sudarytas iš disacharidų, sujungtų β -(1-4) tipo glikozidiniu ryšiu. Disacharidinis fragmentas susideda iš *D*-gliukurono rūgšties ir *N*-acetil-*D*-gliukozamino, sujungtų β -(1-3) tipo glikozidiniu ryšiu (žr. 1.10 pav.) [27]. HR yra vienas iš pagrindinių gliukozaminoglikanų, sudarančių dermą. Ši rūgštis dalyvauja uždegiminio atsako ir žaizdų gijimo procesuose, skatindama ląstelių adheziją, migraciją, proliferaciją ir diferenciaciją [28].



1.10 pav. HR cheminė struktūra

HR yra tinklinama, siekiant pailginti jos rezorbcijos trukmę *in vivo*. Tinklinimui naudojami įvairūs junginiai: glutaro aldehidas, divinilsulfonas, N-hidroksisukcinimidas, polietilenglikolio diglicidilo eteris, 1,4-butandiolio diglicidilo eteris, hidrazidas, metakrilamidas, epichlorhidrinai ir kt. [29–32].

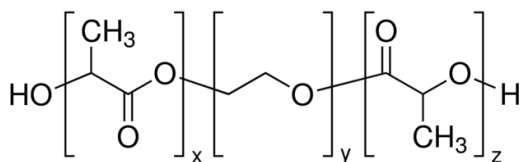
Ištirta, kad nuo HR tinklinimo laipsnio priklauso susidariusio gelio stabilumas, atsparumas fermentų poveikiui *in vivo* [33]. Didinant tinklinančios medžiagos kiekį, HR tinklinimo laipsnis didėja, o gautas gelis pasižymi lėta rezorbcija *in vivo* [34]. Vis dėlto pernelyg dideli tinklinančių medžiagų kiekiai yra toksiški [35].

Rosi (*Rossi S.*) su kolegomis [36] tvarsčius žaizdoms formavo iš HR bei jos kompozitų su chitozono hidrochloridu ar 5-metilpirolidinono chitozanu santykiu 1:1 ir iš jų tyrė chlorheksidino acetato (CHA) atsipalaidavimo kinetiką. Buvo nustatyta, kad iš HR po 48 val. atsipalaidavo didžiausias CHA kiekis – 40 %. Pastebėta, kad dėl elektrostatinės sąveikos tarp polimero ir antiseptiko priešingų krūvių grupių per pirmas 10 val. CHA išsiskyrė lėtai ir jo kiekis siekė tik 13 %, tačiau vėliau dėl dalinio HR ištirpimo, atpalaiduoto CHA kiekis greitai didėjo. CHA išsiskyrimo iš 5-metilpirolidinono chitozono gelio tyrimai parodė, kad jau po 10 val. iš gelio

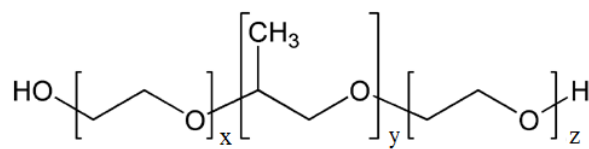
buvo atpalaiduota 20 % CHA, o po 48 val. jo išsiskyrė 35 %. Tokį rezultatą lėmė geros polimero hidratacinės savybės. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad gelis, pagamintas iš chitozano hidrochlorido, pasižymi blogu tirpumu fosfatiniame buferiniame tirpale (pH = 7,2), todėl CHA koncentracija po 48 val. siekė tik 17 %. Sumaišius šiuos polimerus su HR, pastebėta, kad iš 5-metilpirolidinono chitozano ir HR kompozito antiseptikas atpalaiduojamas lėčiau dėl susiformavusio mažai tirpaus kompleksio. Po 48 val. CHA koncentracija siekė 22 %. Iš chitozano hidrochlorido ir HR kompozito per pirmas 10 val. buvo stebimas lėtas CHA išsiskyrimas (22 %) dėl HR ir CHA joninės sąveikos, po to CHA kiekis dėl netirpaus kompleksio susidarymo tarp chitozano hidrochlorido ir HR didėjo lėtai. CHA kiekis po 48 val. siekė 30 %.

1.2. Triblokiniai kopolimerai aktyviųjų junginių pernašai

Geliai plačiai taikomi audinių regeneracijai. Ypač didelis dėmesys skiriamas geliams, kuriuos galima gauti zolio-gelio metodu. Šiam tikslui dažniausiai naudojami blokiniai kopolimerai. Tai kopolimerai, sudaryti iš besikaitaliojančių skirtingų homopolimerų blokų. Jie, priklausomai nuo išorinių veiksnių (temperatūros, pH, joninės jėgos ir kt.) pokyčio, geba sudaryti įvairias micelines struktūras. Audinių inžinerijoje dažniausiai naudojami triblokiniai kopolimerai: poli(pieno rūgšties)-*blok*-poli(etilenglikolio)-*blok*-poli(pieno rūgšties) (PLA-*b*-PEG-*b*-PLA) (žr. 1.11 pav.), poli(etilenoksido)-*blok*-poli(propilenoksido)-*blok*-poli(etilenoksido) (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO) (žr. 1.12 pav.) ir kt. [37].



1.11 pav. PLA-*b*-PEG-*b*-PLA cheminė struktūra¹



1.12 pav. PEO-*b*-PPO-*b*-PEO cheminė struktūra²

Dėl sudėtyje esančių skirtingų homopolimerų blokų jie pasižymi amfifilinėmis savybėmis [38, 39].

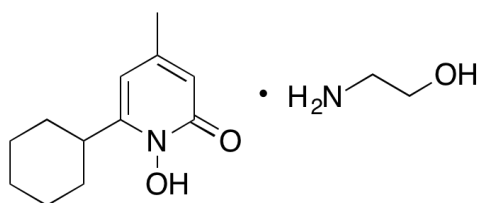
¹ PLA-*b*-PEG-*b*-PLA cheminė struktūra [interaktyvus] [žiūrėta 2018-03-21]. Prieiga per internetą <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/poly lactide block poly ethylene glycol block poly lactide 1234598765?lang=en®ion=LT>

² PEO-*b*-PPO-*b*-PEO cheminė struktūra [interaktyvus] [žiūrėta 2018-03-21]. Prieiga per internetą <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/poly ethylene glycol block poly propylene glycol block poly ethylene glycol 12345900311611?lang=en®ion=LT>

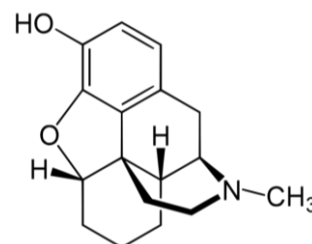
Priklausomai nuo temperatūros, triblokiniai kopolimerai geba formuoti mices – sudaro koloidinius tirpalus. Toliau didinant temperatūrą koloidinis tirpalas dėl micelių agregacijos virsta geliu [40]. Tai idealus būdas ląstelių ar biologiškai aktyvių junginių imobilizavimui ir jų pernašai į žaizdą. Pavyzdžiui, triblokinis kopolimeras yra ištirpinamas tirpale su aktyviais junginiais ir suleidžiamas *in vivo*. Dėl temperatūros pokyčio zolis virsta geliu, kuris veikia kaip aktyviųjų junginių nešiklis, leidžiantis pailginti jų atsipalaidavimo trukmę [41, 42].

Kuriant aktyviųjų junginių tiekimo sistemas žaizdoms gydyti, dažniausiai yra naudojamas triblokinis kopolimeras PEO-*b*-PPO-*b*-PEO, kurį sudaro 70 % PEO ir 30 % PPO [38, 43–44].

Mazurkevičiūtė ir kt. [45] į hidroksoipropilceliuliozės, chitozano ir PEO-*b*-PPO-*b*-PEO gelius imobilizavo antibakterinę vaistinę medžiagą – ciklopirokso olaminą (žr. 1.13 pav.). Mokslininkai tyrimais *in vitro* parodė, kad didžiausias ciklopirokso olamino kiekis atsipalaidavo iš PEO-*b*-PPO-*b*-PEO gelio. Per pirmąsias tris valandas išsiskyrė 50 % vaisto. Visiškai ciklopirokso olaminas atsipalaidavo praėjus 6 val.



1.13 pav. Ciklopirokso olamino cheminė struktūra³



1.14 pav. Morfino cheminė struktūra⁴

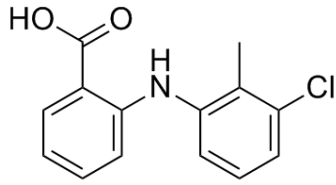
Heilmanas (*Heilmann S.*) su kolegomis [46] pagamino PEO-*b*-PPO-*b*-PEO gelį su morfinu (žr. 1.14 pav.) ir nustatė, kad gelis yra tinkama nešiklio forma morfinui pernešti, nes buvo pasiektas pailgintas vaisto atpalaidavimas bei skausmą malšinantis poveikis.

Atliktų mokslinių tyrimų rezultatai parodė, kad PEO-*b*-PPO-*b*-PEO gerina sunkiai vandenyje tirpių junginių (insulino, indometacino, piroksikamo ir kt.) tirpumą [42].

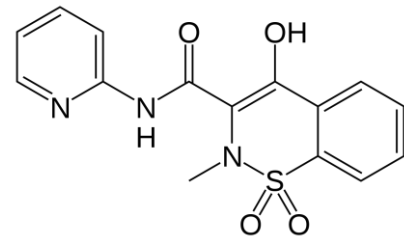
Cafagis (*Cafaggi S.*) ir kt. [47] tyrė PEO-*b*-PPO-*b*-PEO savybę tirpinti tolfenamo rūgštį (žr. 1.15 pav.) – nesteroidinį vaistą nuo uždegimo, kuris pasižymi skausmą malšinančiu poveikiu.

³ Ciklopirokso olamino cheminė struktūra [interaktyvus] [žiūrėta 2018-03-29]. Prieiga per internetą https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?drug:D01364

⁴ Morfino cheminė struktūra [interaktyvus] [žiūrėta 2018-03-29]. Prieiga per internetą <https://en.wikipedia.org/wiki/Morphine>



1.15 pav. Tolfenamo rūgšties cheminė struktūra⁵



1.16 pav. Piroksikamo cheminė struktūra⁶

Tolfenamo rūgšties tirpumas padidėjo net 2000 kartų, o gautas gelis pasižymėjo pailgintu tolfenamo rūgšties atpalaidavimu. Tai suteikė galimybę tolfenamo rūgštį vartoti vietiškai.

Jungas (*Jung Y. S.*) su kitais mokslininkais [48] tyrė piroksikamo (žr. 1.16 pav.), taip pat nesteroidinio vaisto, atsipalaidavimo kinetiką iš PEO-*b*-PPO-*b*-PEO ir PEO-*b*-PPO-*b*-PEO su HR gelių. Iš triblokinio kopolimero su HR gelio piroksikamo per 24 val. išsiskyrė 10 %, o po 10 dienų buvo pasiektas visiškas vaisto atsipalaidavimas. Iš gelio be HR jau po 50 val. buvo išsiskyrę 50 % piroksikamo. Į triblokinio kopolimero gelį imobilizuota HR pailgino vaisto atsipalaidavimą.

⁵ Tolfenamo rūgšties cheminė struktūra [interaktyvus] [žiūrėta 2018-03-29]. Prieiga per internetą https://en.wikipedia.org/wiki/Tolfenamic_acid

⁶ Piroksikamo cheminė struktūra [interaktyvus] [žiūrėta 2018-03-29]. Prieiga per internetą <https://en.wikipedia.org/wiki/Oxicam>

1.3. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir projekto tikslo pagrindimas

Pasaulyje intensyviai tiriamos biomedžiagos, skirtos audinių regeneracijai. Joms gauti naudojami tiek sintetiniai, tiek gamtiniai polimerai, kurie yra netoksiški, neimunogeniški, pasižymi suderinamumu su biologinėmis sistemomis bei kontroliuojama bioskaida. Iš polimerų formuojami geliai, plėvelės, granulių ar bloko pavidalo karkasai, skirti žaizdoms gydyti. Visais atvejais yra pabrėžiama tai, kad jie privalo ne tik saugoti žaizdą nuo infekcijos, bet ir ją drėkinti, absorbuoti išskyras, atpalaiduoti žaizdos gijimą skatinančius aktyviuosius junginius, sukurti tinkamą terpę audinių regeneracijai.

Didelis dėmesys skiriamas aktyviųjų junginių pernašos sistemoms, siekiant pailginti jų atsipalaidavimo trukmę.

Atlikus literatūros apžvalgą, šiame projekte iškeltas tikslas – suformuoti hialurono rūgšties karkasus, skirtus minkštųjų audinių regeneracijai.

Manoma, kad priklausomai nuo žaizdos anatominės vietos, HR karkasuose imobilizuoti aktyvieji junginiai apsaugotų nuo bakterinio užkrato ar skatintų sunkiai gyjančių žaizdų gijimą, regeneraciją.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

Šioje darbo dalyje yra aprašomos tyrimams naudotos medžiagos, tyrimų metodai, naudojami prietaisai ir jų pagrindiniai technologiniai parametrai.

2.1. Naudotos medžiagos

Projekte naudotos medžiagos nurodytos 2.1 lentelėje. Naudotos medžiagos papildomai gryninamos nebuvo.

2.1 lentelė. Tyrimams naudotos medžiagos

Medžiaga	Gamintojas arba tiekėjas, grynumo klasė
Acto rūgštis	Sigma-Aldrich, Vokietija, analitiškai gryna, konc. 99,8–100,5 %
Chlorheksidino digliukonatas	UAB „Ažuolyno vaistinė“, Lietuva, konc. 1 %
Dinatrio vandenilio tetraoksofosfatas	Merck, Vokietija, chemiškai švarus 99 %
Druskos rūgštis	Chempur, Lenkija, analitiškai gryna, konc. 35–38 %
Fibroblastų augimo faktorius	Sigma-Aldrich, Vokietija
Hialurono rūgštis	Soliance, Prancūzija, < 20000 Da
Imunofermentinei analizei atlikti skirtas ELISA rinkinys	Thermo Fisher Scientific, JAV
Joduotas povidonas	EGIS Pharmaceuticals PLC, Vengrija
Kalio bromidas	Eurochemicals, Lietuva, chemiškai švarus $\geq 99,0$ %
Kalio chloridas	Merck, Vokietija, chemiškai švarus $\geq 99,5$ %
Natrio chloridas	Chempur, Lenkija, chemiškai švarus 99,5 %
Natrio divandenilio tetraoksofosfatas dihidratas	Merck, Vokietija, chemiškai švarus 99,0 %
Natrio hialuronatas	Soliance, Prancūzija, $2 \cdot 10^6$ Da
Natrio hidroksidas	Stanlab, Lenkija, chemiškai švarus 97,0 %
Natrio tiosulfato tirpalas	Merck, Vokietija, konc. 0,1 mol/l

Medžiaga	Gamintojas arba tiekėjas, grynumo klasė
Poli(etilenoksidas)-blok-poli(propilenoksidas)-blok-poli(etilenoksidas)	Sigma-Aldrich, Vokietija, <i>Pluronic</i> [®] <i>F-127</i>
1,4-butandiolio diglicidilo eteris	Sigma-Aldrich, Vokietija, chemiškai švarus 95 %

2.2. Natrio hialuronato tinklinimas

Analitinėmis svarstyklėmis *KERN ABJ* (KERN & Sohn GmbH, Vokietija) įbėrus į kolbą pasveriami 0,6 g natrio hialuronato ir įpilama 6 ml 1 % koncentracijos natrio hidroksido tirpalo. Tirpalas kaitinamas vandens vonioje iki 50 °C temperatūros, tada įpilama 0,06 ml 1,4-butandiolio diglicidilo eterio. Reakcija vykdoma 1,5 val. nuolat maišant minėtoje temperatūroje. Gelis išpilstomas į lėkštutes ir laikomas 24 val. kambario (20 ± 1 °C) temperatūroje. Gautas gelis užpilamas 0,05 mol/l druskos rūgštis tirpalu ir laikomas 4 val., po to plaunamas distiliuotu vandeniu iki neutralios terpės. Gelis smulkinamas homogenizatoriumi *IKA T18 digital ULTRA TURRAX* (IKA, Vokietija) 10 min., didinant apsukų skaičių nuo 3200 aps./min. iki 6000 aps./min., siekiant suformuoti gelio granules.



2.1 pav. Liofilizatorius⁷

⁷ Liofilizatorius [interaktyvus] [žiūrėta 2018-03-09]. Prieiga per internetą <https://apcis.ktu.edu/lt/site/katalogas?more=6341>

Mėginiai liofilizuojami *ALPHA 2–4 LSC* (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Vokietija) liofilizatoriuje 24 val.

2.3. Infraraudonųjų spindulių molekulinė absorbcinė spektrinė analizė

Infraraudonųjų spindulių molekulinė absorbcinė spektrinė analizė atliekama spektrofotometru *Perkin Elmer SPECTRUM GX FT-IR* (Perkin Elmer, Anglija). Agato grūstuvėje sutrinama 0,001 g medžiagos, pridedama 0,2 mg KBr ir presuojant paruošiami tabletės pavidalo bandiniai. Absorbcija tiriama infraraudonojo spektro pagrindiniame diapazone nuo 4000 cm⁻¹ iki 400 cm⁻¹.

2.4. Skenuojančioji elektroninė mikroskopija

Karkasų morfologija tiriama aukštos skiriamosios gebos skenuojančiu elektroniniu mikroskopu *Quanta 200 FEG* (FEI, Olandija) su Šotki tipo elektronų patranka. Naudojami didinimai 200 ir 1000 kartų.

2.5. Skysčių sorbcija

Sausi mėginiai merkami į fosfatinį buferinį tirpalą (pH = 7,4), tiksliai fiksuojant įmerkimo laiką. Mėginiai laikomi 37 °C temperatūroje iki kol susidaro pusiausviroji sistema. Pasirinktais laiko tarpais (po 1, 2, 3, 4, 5 ir 6 val.) mėginiai išimami, nusausinami filtriniu popierėliu ir pasveriami. Skysčių sorbcija apskaičiuojama pagal formulę:

$$S = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \cdot 100, \quad (2.1)$$

čia S – skysčių sorbcija, %; m_0 – sauso mėginio masė, g; m_1 – drėgno mėginio masė, g.

2.6. Drėgmės kiekio nustatymas

Biuksiukai kartu su dangteliais džiovinami 1 val. 100 °C temperatūroje džiovinimo krosnelėje *Binder ED53* (Binder, Vokietija). Iškaitinti biuksiukai ir jų dangteliai atvėsunami eksikatoriuje ir pasveriami.

Į biuksiuką įdedamas mėginys ir uždengtas biuksiukas pasveriamas. Paruošiami 3 biuksiukai su mėginiais. Biuksiukai su mėginiais džiovinami 100 °C temperatūroje iki kol nusistovi pastovi masė. Baigus džiovinti, biuksiukai vėsunami eksikatoriuje ir pasveriami. Apskaičiuojamas drėgmės kiekis X (%) pagal formulę:

$$X(\%) = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \cdot 100 \quad (2.2)$$

čia m_1 – gelio masė prieš džiovinimą, g; m_2 – mėginio masė po džiovinimo, g.

2.7. Karkasų akytumas

Mėginiai (apie 0,01 g) merkami į 4 ml 96,3 % etilo alkoholį ir laikomi 6 val. 37 °C temperatūroje. Siekiant, kad etilo alkoholis užpildytų visas akutes, mėgintuvėliai su mėginiais 3 min. dedami į ultragarso vonelę *Transsonic 460* (Elma, Vokietija). Mėgintuvėlius išėmus iš vonelės, nustatomas bendras mėginio ir etilo alkoholio tūris. Mėginiai ištraukiami ir nustatomas etilo alkoholio likutis. Karkaso akytumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$A = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \cdot 100, \quad (2.3)$$

čia A – karkaso akytumas, %; V_1 – pradinis etilo alkoholio tūris, ml; V_2 – bendras mėginio ir etilo alkoholio tūris, ml; V_3 – etilo alkoholio likutis, ml.

2.8. Joduoto povidono imobilizavimas karkasuose ir jodo atsipalaidavimo tyrimai

Tinklintos hialurono rūgšties (t-HR_D) blokų pavidalo karkasai (mėginio masė 0,01 g) inkliuduojami 0,3 ml joduoto povidono (JP) tirpalu.

Jodo atsipalaidavimo kinetika iš t-HR_D karkasų tiriama remiantis Europos Farmakopėjos 8.0 straipsnyje (01/2012:2416) nurodyta metodika.

Suformuoti t-HR_D su imobilizuotu JP mėginiai merkami į 20 ml distiliuoto vandens. Mėginiai, apsaugant juos nuo šviesos, maišomi kambario temperatūroje. Nustatytais laiko tarpais imama po 1 ml bandinio, įpilama 0,1 ml praskiestos acto rūgšties tirpalo ir 0,15 ml krakmolo tirpalo. Bandiniai titruojami 0,01 mol/l koncentracijos natrio tiosulfato tirpalu, kol išnyksta esama mėlyna tirpalo spalva. 1 ml tiosulfato tirpalo atitinka 1,269 mg atsipalaidavusio jodo.

Acto rūgšties ir indikatoriaus tirpalai ruošiami remiantis Europos Farmakopėjos 8.0 straipsniu 01/2011:40 101.

Acto rūgšties tirpalas paruošiamas ledinę acto rūgštį (12 g) praskiedžiant iki 100 ml distiliuotu vandeniu. Indikatoriaus tirpalo paruošimui atsveriamas krakmolas (1 g) ir įpilama 5 ml distiliuoto vandens. Tirpalas supilamas į 100 ml 100 °C temperatūros distiliuoto vandens, ataušinamas ir nufiltruojamas.

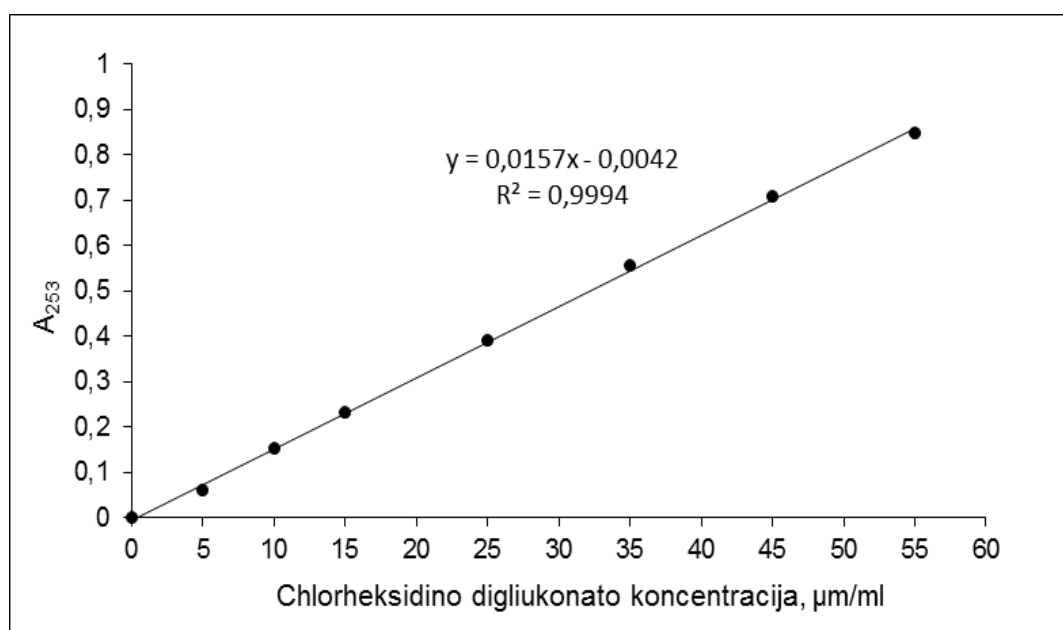
2.9. Chlorheksidino digliukonato imobilizavimas ir jo atsipalaidavimo iš karkasų tyrimai

Paruošiamos dvi t-HR_D mėginių grupės. Ant pirmos grupės mėginių (vieno mėginio masė 0,01 g) iš lėto užpilama po 0,16 ml 0,5 % koncentracijos chlorheksidino digliukonato (CHD) tirpalo. Ant antros mėginių grupės užpilama po 0,08 ml 1 % koncentracijos mažos molekulinės masės hialurono rūgšties (HR_M) tirpalo, po 10 min. užpilama po 0,08 ml 1 % koncentracijos

CHD tirpalo. Mėginiai (t-HR_D-CHD ir t-HR_DHR_M-CHD) šaldomi -25 °C temperatūroje ir liofilizuojami.

Atliekamas CHD atsipalaidavimo iš karkasų tyrimas. Šiam tikslui karkasai merkami į 30 ml 0,9 % koncentracijos natrio chlorido tirpalo, tiksliai fiksuojant įmerkimo laiką. CHD atsipalaidavimo iš karkasų tyrimai atliekami 37 °C temperatūroje. Skirtingais laiko tarpais (po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 val.) imama po 1,4 ml tirpalo ir spektrofotometru *Cary 50 UV-VIS* (Varian, Inc., Olandija) matuojama tirpalo šviesos sugertis, esant 253 nm bangos ilgiui.

CHD koncentracija apskaičiuojama remiantis gradavimo grafiku (žr. 2.2 pav.), kuris vaizduoja spindulių sugerties A priklausomybę nuo CHD koncentracijos c : $A=f(c)$.



2.2 pav. Chlorheksidino digliukonato gradavimo grafikas

Gradavimo grafikui sudaryti paruošiami 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55 µg/ml koncentracijos CHD tirpalai. Pirmiausiai iš 1 % koncentracijos (0,01 g/ml) CHD tirpalo pagaminamas 0,01 % koncentracijos (100 µg/ml) tirpalas: imama 0,25 ml 1 % koncentracijos CHD tirpalo ir distiliuotu vandeniu praskiedžiama iki 25 ml. Norint gauti kalibracinei kreivei sudaryti reikalingas CHD tirpalo koncentracijas, atitinkamai paimama 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2,5 ml, 3,5 ml, 4,5 ir 5,5 ml 0,01 % koncentracijos (100 µg/ml) tirpalo ir matavimo kolbose distiliuotu vandeniu praskiedžiama iki 10 ml.

2.10. Antibakterinių savybių tyrimas

Antibakterinių savybių tyrimai atlikti KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje.

Antibakterinių savybių tyrimams naudojami mėginiai, paruošti pagal 2.8 skyrelyje aprašytą metodiką. Tyrimams naudojamos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*

aureus, *Staphylococcus epidermidis* bakterijos, augintos ant nuožulnaus agaro (Liofilchem, Italija) 37 °C temperatūroje 18–20 val. Užaugintų kultūrų ląstelės kilpele perkeliamos į fiziologinį tirpalą (0,85 % natrio chlorido tirpalą). Paruošta bakterijų suspensija praskiedžiama fiziologiniu tirpalu naudojantis *McFarland* standartu, pagal kurį bakterijų skaičius yra iki 10⁶ KSV/ml. Šios suspensijos 1 ml sumaišomas su mitybine terpe (100 ml), kuri prieš tai atvėsinama iki 48–52 °C temperatūros. Paruošta terpė su bakterijomis išpilstoma į *Petri* lėkšteles, laikantis aseptinių sąlygų. Paruoštos lėkštelės paliekamos ant lygaus paviršiaus, kad mitybinė terpė sustingtų. Ant sustingusios terpės paviršiaus dedami t-HR_D-CHD ir t-HR_DHR_M-CHD mėginiai (7×8 mm). Lėkštelės su mėginiais inkubuojamos 37 °C temperatūroje 24 val. Po inkubacijos mėginių antibakterinis poveikis vertinamas pagal susidariusias inhibicijos zonas.

2.11. Tinklintos hialurono rūgšties aktytų granulių su triblokiniu kopolimeru paruošimas

Pasveriamas 2 g triblokinio kopolimero (*Pluronic*® *F-127*), užpilama 8 g fosfatinio buferinio tirpalo (pH = 7,4) ir nepertraukiamai maišoma 4 val. 4 °C temperatūroje iki visiško kopolimero ištirpimo. Taip paruošiamas 10 ml 20 % koncentracijos triblokinio kopolimero tirpalas. Aktytos t-HR_D granulės (1–1,5 % pagal masę) inkliuduojamos kopolimero tirpalu.

2.12. Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija

20 % triblokkopolimero tirpalo ir juo inkliudotų granulių diferencinės skenuojamosios kalorimetrijos (DSK) kreivės užrašomos *Perkin Elmer DSC 8500* (JAV) terminiu analizatoriumi (žr. 2.3 pav.).



2.3 pav. Diferencinis skenuojantis kalorimetras⁸

⁸ Diferencinis skenuojantis kalorimetras [interaktyvus] [žiūrėta 2018-04-19]. Prieiga per internetą <https://apcis.ktu.edu/lt/site/search?keys=Diferencinis%20skenuojantis%20kalorimetras>

Mėginiai patalpinami į aliuminius tiglius, hermetiškai uždaromi ir kaitinami 5–60 °C temperatūroje, didinant temperatūrą 5 °C/min. greičiu azoto atmosferoje.

2.13. Tinklintos hialurono rūgšties aktyvų granulių su triblokiniu kopolimeru ir imobilizuotu fibroblastų augimo faktoriumi paruošimas

Paruošiamas 0,25 µg/ml koncentracijos fibroblastų augimo faktoriaus (FGF) tirpalas fosfatiniame buferiniame tirpale (pH = 7,4).

Suformuotos t-HR_D granulės (apie 0,005 g) inkliuduojamos fosfatinu buferiniu tirpalu arba 20 % triblokinio kopolimero tirpalu. Ant kiekvienos grupės granulių užpilama po 40 µl FGF tirpalo.

2.14. Fibroblastų augimo faktoriaus atsipalaidavimo kinetika

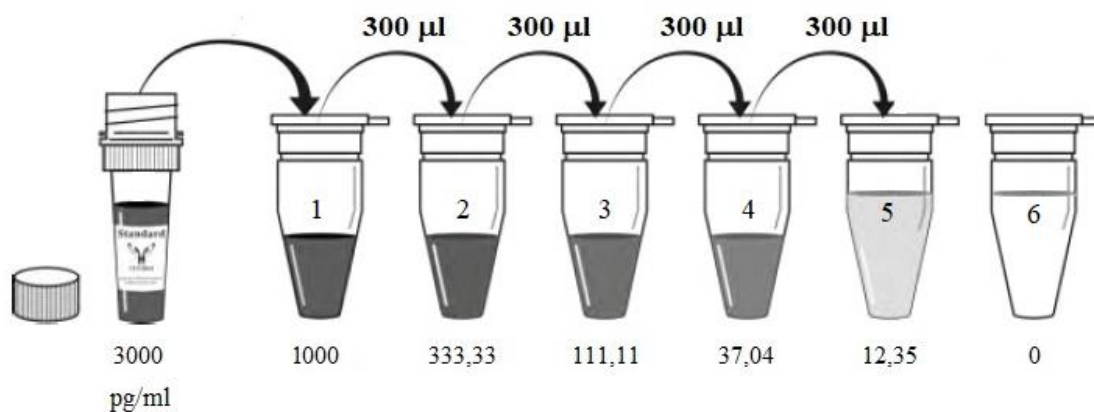
Mėginiai užpilami 5 ml fosfatinu buferiniu tirpalu (pH = 7,4) ir laikomi 37 °C temperatūroje. Skirtingais laiko tarpais (po 1, 3 ir 7 parų) paimama po 100 µl mėginio. Surinkti mėginiai iki analizės laikomi šaldiklyje -25 °C temperatūroje.

Atpalaiduotas FGF kiekis tiriamas naudojant imunofermentinį (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, toliau – ELISA) metodą. Mėginiai paruošiami vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis [49]. Visi rinkinyje esantys reagentai ir reikmenys, pateikti 2.2 lentelėje, prieš tyrimą atšildomi iki kambario (20 ± 1 °C) temperatūros.

2.2 lentelė. Rinkinys kiekybiniam FGF nustatymui pagal ELISA metodą

96 šulinėlius turinti plokštelė, padengta monokloniniais antikūnais, specifiniais FGF	1 vnt.
Plokštelės dangteliai	4 vnt.
FGF standartas	1 buteliukas
Reagentas A	1 buteliukas
Reagentas B	0,12 ml
Reagentų tirpinimui skirtas tirpalas	0,3 ml
Tetrametilbenzidinas (TMB)	9 ml
Plovimui skirtas buferinis tirpalas	20 ml
FGF standarto tirpinimui ir praskiedimui skirtas buferinis tirpalas	20 ml
Reagento A skiedimui skirtas tirpalas	12 ml
Reagento B skiedimui skirtas tirpalas	12 ml
Reakciją stabdantis tirpalas	6 ml

FGF kalibracinės kreivės sudarymui paruošiami 1000 pg/ml, 333,33 pg/ml, 111,11 pg/ml, 37,04 pg/ml, 12,35 pg/ml, 0 pg/ml koncentracijų FGF tirpalai. Pirmiausiai liofilizuotas FGF yra ištirpinamas užpylus 1000 μ l jo tirpinimui skirtu buferiniu tirpalu. Taip paruošiamas tirpalas, kurio koncentracija – 3000 pg/ml. Iš šio tirpalo paruošiamas standartinis FGF 1000 pg/ml koncentracijos tirpalas. Šiam tikslui imama 300 μ l 3000 pg/ml FGF tirpalo ir praskiedžiama iki 900 μ l standarto skiedimui skirtu buferiniu tirpalu. Tolesni tirpalų skiedimai kalibracinės kreivės sudarymui pateikiami 2.4 paveiksle.



2.4. pav. Tirpalų, skirtų kalibracinės kreivės sudarymui, ruošimo schema

Tyrimams atlikti tiriamieji tirpalai praskiedžiami distiliuotu vandeniu 2 kartus, o plokštelės šulinėlių plovimui skirtas buferis – 30 kartų. Reagentas A ištirpinamas į buteliuką su reagentu įpylus 150 μ l reagento tirpinimui skirtu buferinio tirpalo. Po 10 min. laikymo kambario temperatūroje (20 ± 1 °C) buteliukas supurtomas ir Reagentas A skiedžiamas jam skirtu tirpalu santykiu 1:100. Reagentas B skiedžiamas jo skiedimui skirtu tirpalu santykiu 1:100 (žr. 2.2 lentelę).

Į plokštelės šulinėlius įpilama po 50 μ l kalibracinei FGF kreivei sudaryti paruoštų tirpalų ir tiriamų mėginių. Tuomet į kiekvieną šulinėlį įpilama po 50 μ l Reagento A. Plokštelė uždengiama ir inkubuojama 1 val. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos iš plokštelės šulinėlių tirpalai išpilami, ir šulinėliai plaunami tam skirtu buferiniu tirpalu kiekvienam šulinėlio plovimui naudojant 350 μ l tirpalo. Plovimas kartojamas 3 kartus. Po to į šulinėlius įpilama po 100 μ l Reagento B. Plokštelė uždengiama ir inkubuojama 30 min. 37 °C temperatūroje. Po inkubavimo tirpalas nupilamas, ir plokštelės šulinėliai plaunami 5 kartus. Tuomet į kiekvieną šulinėlį įpilama po 90 μ l TMB substrato. Šulinėliai uždengiami ir inkubuojami tamsoje 15 min. 37 °C temperatūroje. Į šulinėlius įpilama po 50 μ l reakciją blokuojančio tirpalo ir daugiakanaliu spektrofotometru *FLUOstar Omega* (BMG Labtech, Vokietija) iš karto matuojama tirpalų šviesos sugertis, esant 450 nm bangos ilgiui.

2.15. Statistinė duomenų analizė

Rodiklių, tirtų darbe, vidutinės ir standartinio nuokrypio vertės apskaičiuojamos naudojant *MS Excel* programinį paketą.

Aritmetinis vidurkis A apskaičiuojamas pagal formulę:

$$A = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i \quad (2.4)$$

čia n – reikšmių kiekis; a – nario reikšmė; i – aibės duotasis narys.

Standartinis nuokrypis SN apskaičiuojamas pagal formulę:

$$SN = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (a_i - A)^2} \quad (2.5)$$

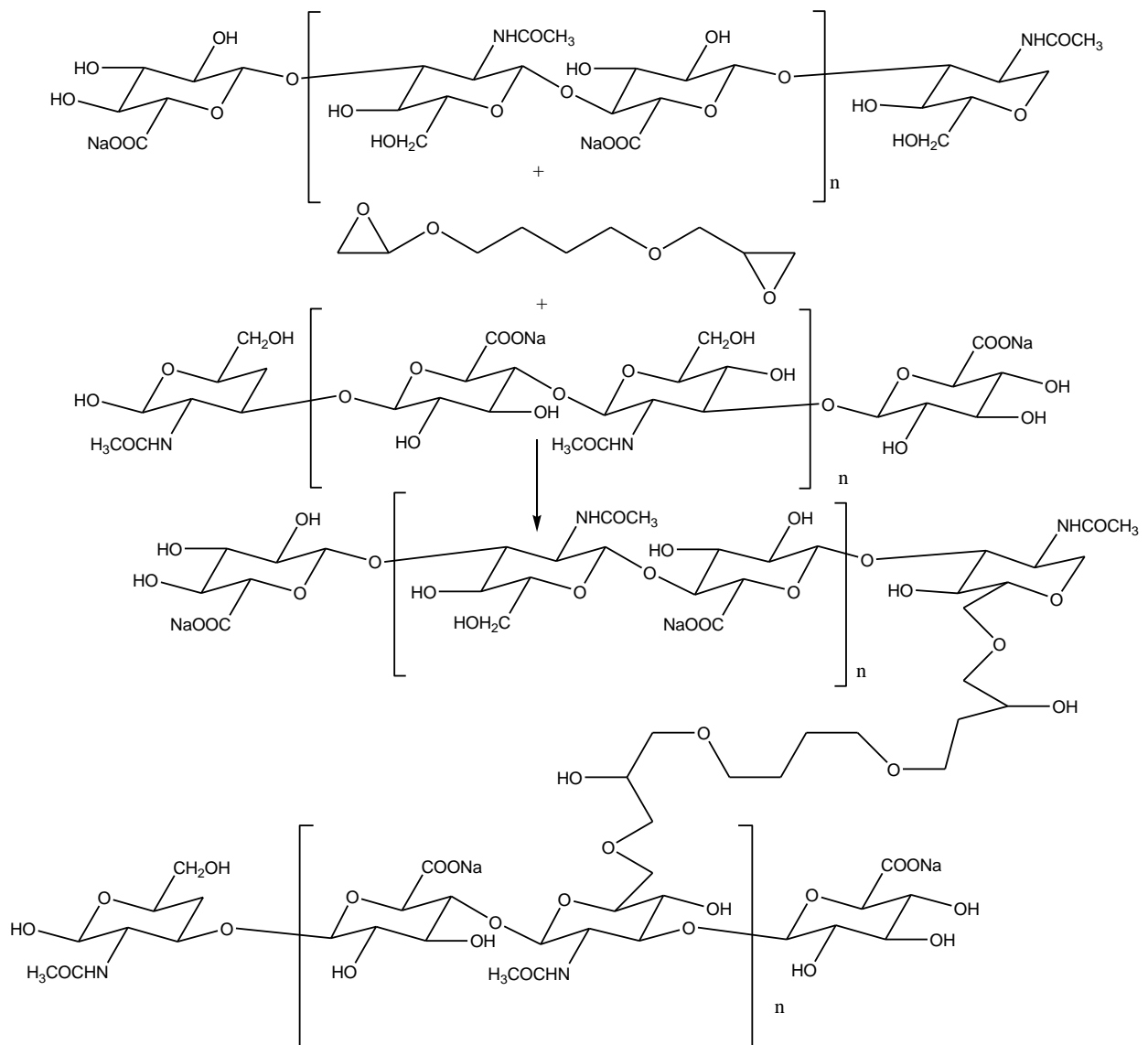
Atliekant JP, CHD, FGF atsipalaidavimo kinetikos tyrimus ir skysčių sorbcijos, drėgmės kiekio, karkasų akytumo tyrimus, $n = 3$. Atliekant antibakterinių savybių tyrimus, $n = 4$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Tinklintos hialurono rūgšties aktyvų granulių ir bloko pavidalo karkasų gavimas

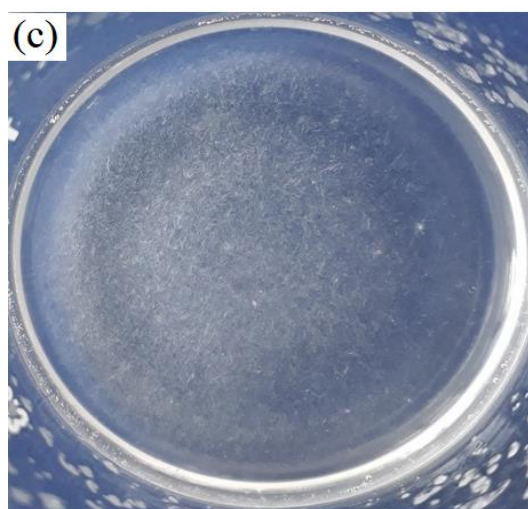
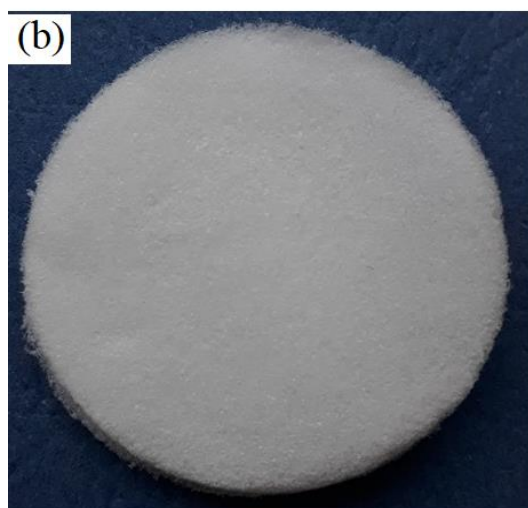
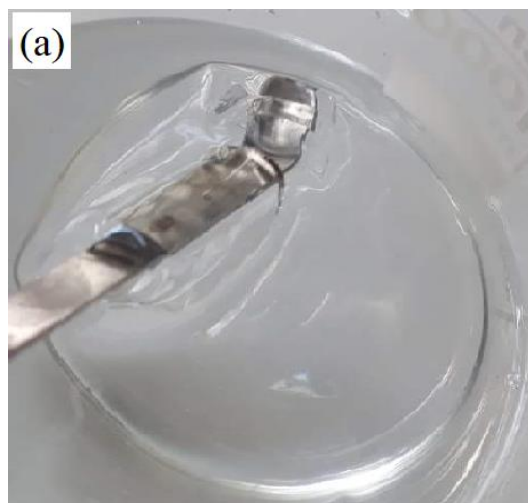
Šio projekto metu buvo suformuoti aktyvi tinklintos HR_D (t-HR_D) granulių ar bloko pavidalo karkasai su imobilizuotais aktyviais junginiais, kurie pasižymi priešuždegiminėmis, antimikrobinėmis ar audinių regeneraciją skatinančiomis savybėmis.

Pirmiausiai buvo gautas fiziologinėje terpėje netirpus t-HR_D gelis, tinklinant polimerą 1,4-butandiolio diglicidilo eteriu. Reakcijos mechanizmo schema pateikta 3.1 paveiksle.



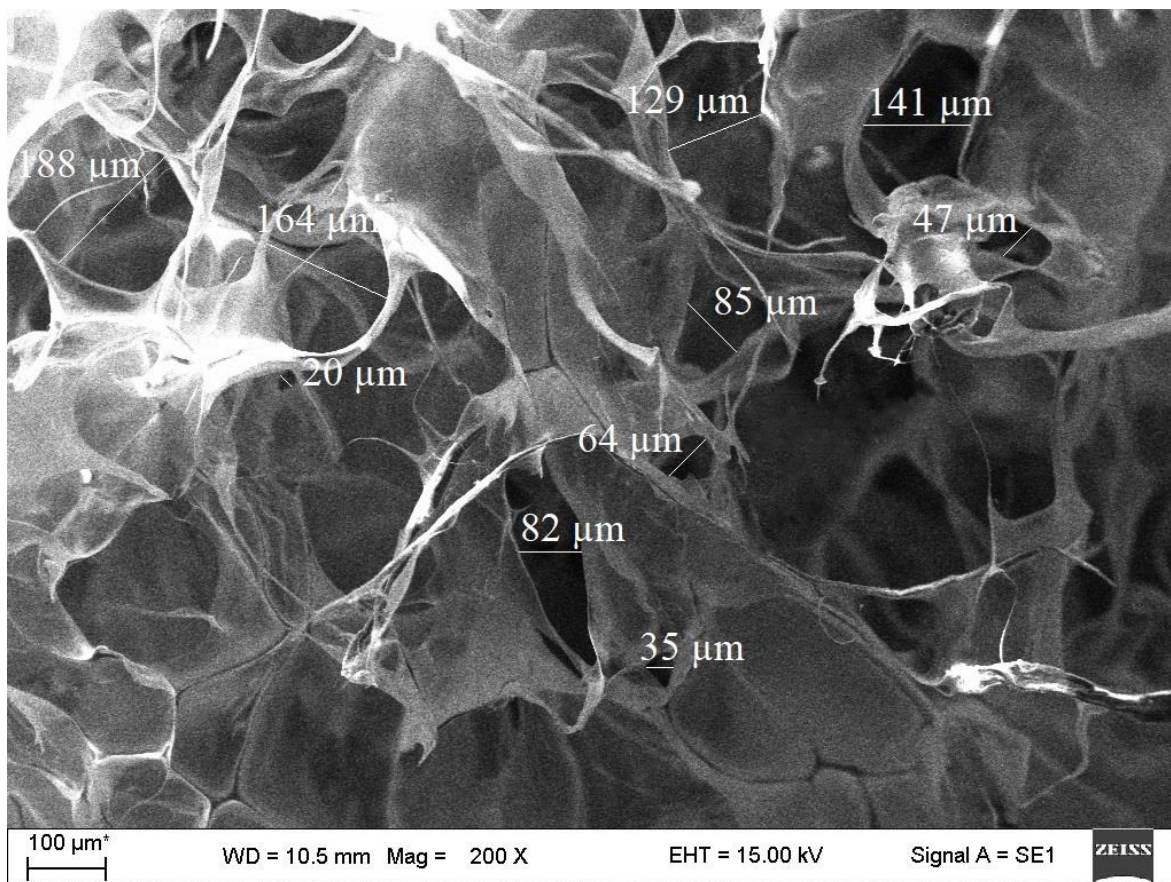
3.1 pav. Natrio hialuronato tinklinimo schema

Akyti t-HR_D bloko bei granulių pavidalo karkasai (žr. 3.2 pav.) buvo formuojami naudojant liofilizacijos metodą [50].



3.2 pav. Nuotraukos: gelio (a); t-HR_D bloko pavidalo karkaso (b); t-HR_D granulių (c)

Siekiant ištirti akytų t-HR_D granuliu ir bloko pavidalo karkasų morfologiją, buvo atlikti SEM tyrimai. SEM nuotraukos pateiktos 3.3 ir 3.4 paveiksluose.

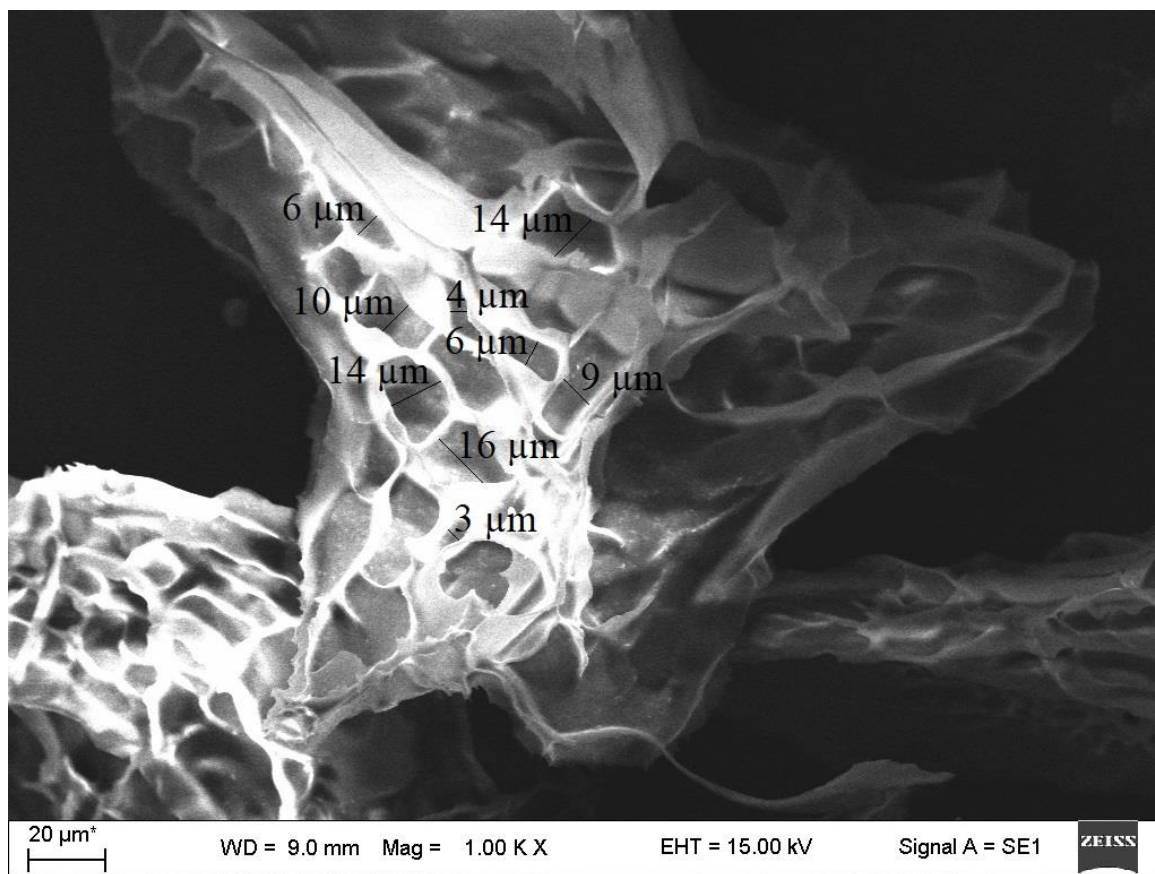


3.3 pav. Suformuoto t-HR_D karkaso SEM nuotrauka (padidinta 200 kartų)

Iš SEM nuotraukos (žr. 3.3 pav.) matyti, kad po t-HR_D gelio liofilizavimo formuojasi akvata karkaso struktūra. Karkasų akvatumas siekia 50 %. Iš nuotraukos galima matyti, kad akvates yra nesimetriškos, jos jungiasi viena su kita ir sudaro pralaidžius kanalus. Akvacių dydis kinta nuo 20 μm iki 188 μm.

Iš SEM nuotraukos (žr. 3.4 pav.) matyti, kad granulės taip pat yra akvatos, akvates išsidėsčiusios tolygiai, jų dydis kinta nuo 3 μm iki 16 μm.

KTU Polimerų chemijos ir technologijos katedroje nustatyta, kad pagal 2.2 skyrelyje aprašytą metodiką formuojamų granuliu vidutinis dydis yra $272 \pm 0,1 \mu\text{m}$ [51].



3.4 pav. Suformuotų t-HR_D granulių SEM nuotrauka (padidinta 1000 kartų)

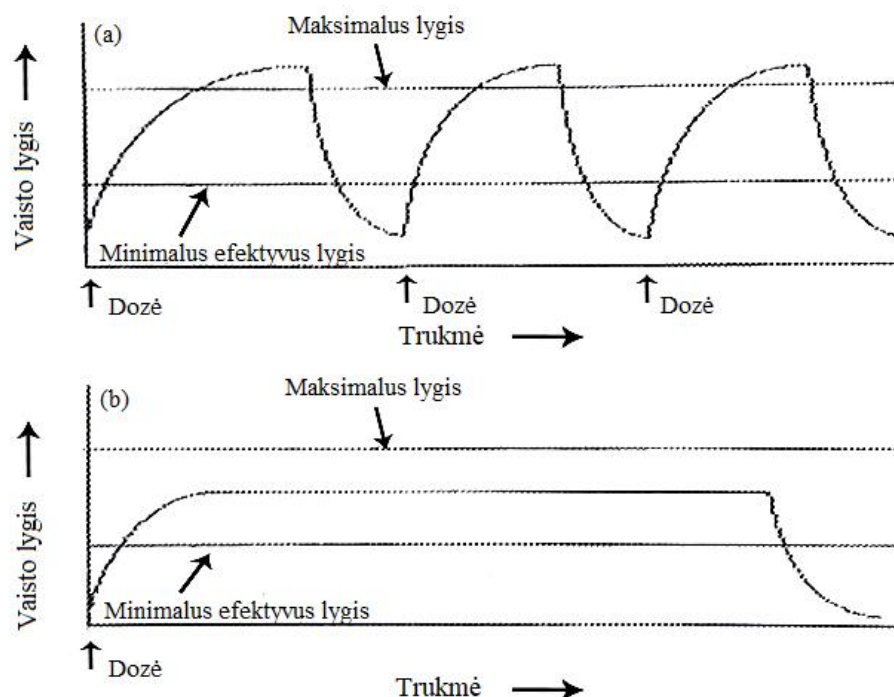
Atlikus karkasų sorbcijos tyrimus fosfatiname buferiniame tirpale nustatyta, kad aktytos struktūros t-HR_D bloko pavidalo karkasai geba sorbuoti daugiau skysčių negu jo yra neliofilizuotame gelyje. Ištirta, kad 1 g karkaso geba sorbuoti $76 \text{ g} \pm 0,6$ fosfatinio buferinio tirpalo, o 1 g HR gelio yra tik $0,99 \pm 1,2$ g tirpalo. Nustatyta, kad granulės sorbuoja mažiau skysčių, lyginant su bloko pavidalo karkasais. 1 g granulių geba sorbuoti $29 \pm 1,7$ g fosfatinio buferinio tirpalo.

Karkasų morfologija – viena svarbiausių jų charakteristikų, turinčių įtakos jų sorbcinėms savybėms. Suformuoti t-HR_D bloko pavidalo karkasai dėl didesnių akučių geba sorbuoti daugiau skysčių nei granulės.

3.2. Aktyviųjų junginių imobilizavimas karkasuose

Gydant tam tikros rūšies žaizdas, ypač lėtinis, yra skiriamos įvairios vaistinės medžiagos. Tačiau daugelis naudojamų preparatų, pavyzdžiui, tirpalai ar purškalai, nepasižymi adhezinėmis savybėmis, dalis aktyviųjų junginių iš jų gali greitai išsiskirti, viršydami reikiamą terapeutinę koncentraciją. Siekiant palaikyti vienodą terapinę vaisto koncentraciją yra sukurtos reguliuojamos aktyviųjų junginių atpalaidavimo sistemos, iš kurių vaistinės medžiagos gali būti

išskiriamos lėtai, pastoviu greičiu, tokiu būdu ilgiau išlaikant reikiamą vaisto koncentraciją žaizdoje [52]. Vaisto farmakokinetika iš tokių sistemų pavaizduota 3.5 pav.



3.5 pav. Vaisto kiekis kraujyje: tradicinėse vaistų atpalaidavimo sistemose (a); reguliuojamose (b)⁹

Vaistų kontroliuojamo atpalaidavimo sistemoms kurti dažniausiai pasirenkami polimerai, kurie yra suderinami su biologinėmis sistemomis, mechaniškai tvirti bei užtikrina vaisto pasiskirstymą audiniuose, nes per didelė koncentracija gali sukelti šalutinį poveikį [53].

3.2.1. Tinklintos hialurono rūgšties karkasai su imobilizuotu joduotu povidonu

Antiseptikai – tai cheminės medžiagos, kurios yra naudojamos vietiškai ant pažeistos odos ir žaizdų. Jie efektyviausiai gydo traumos sukeltas ir lėtines žaizdas, kurios užterštos įvairių rūšių mikroorganizmais. Vieni iš plačiausiai naudojamų yra jodo turintys antiseptikai [7]. Iš jų dažniausiai pasirenkamas joduotas povidonas (JP). Tai iš polivinilpirolidono (PVP) ir jodo sudarytas kompleksinis junginys, iš kurio jodas yra lėtai atpalaiduojamas. Šis kompleksas yra plačiu antibakteriniu spektru, įskaitant periodonto sukėlėjus, mikobakterijas bei virusus, pasižymintis antiseptikas, kuris yra efektyvus lėtinėms, sunkiai ir ilgai gyjančioms žaizdoms

⁹ Vaisto kiekis kraujyje tradicinėse (a) ir reguliuojamose (b) vaistų atpalaidavimo sistemose. HELLER, J., S. H. PANGUM and D. W. H. PENHALE. Use of bioerodible polymers in self-regulated drug delivery systems. *ACS Symposium Series*. 1987, 348, 172–187. ISSN 0097-6156.

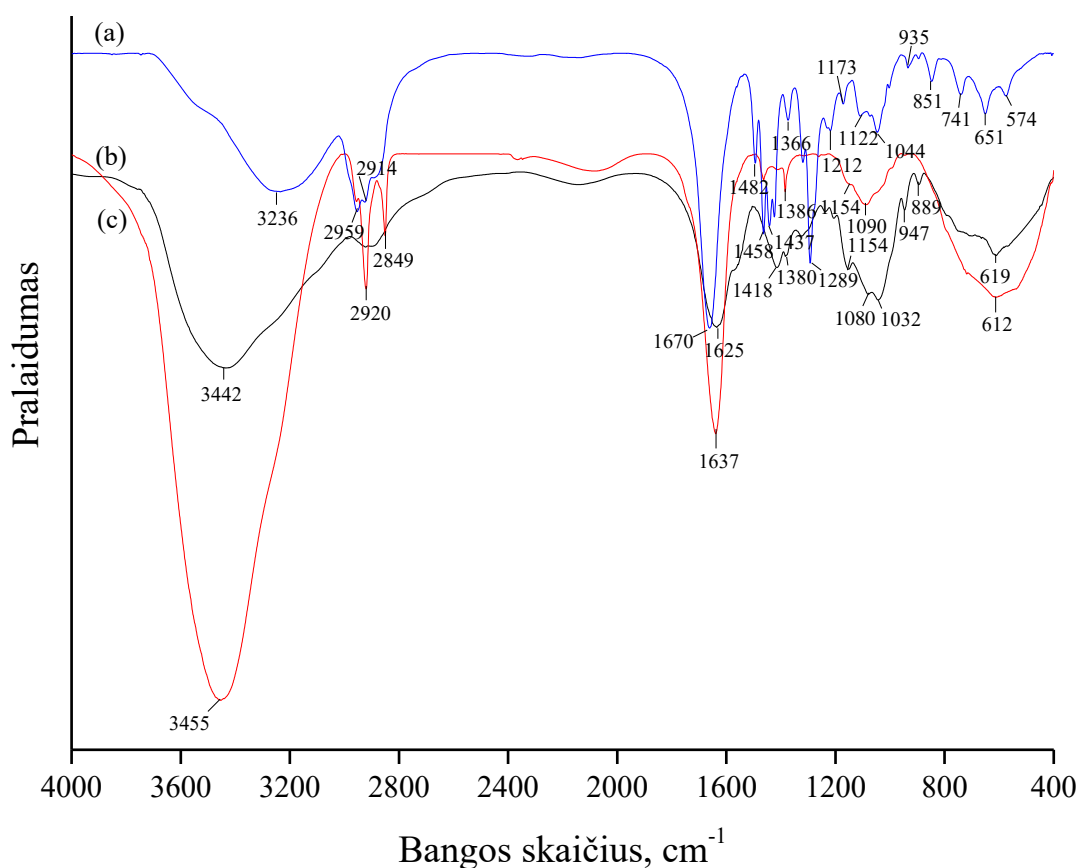
gydyti. Jodas yra susijungęs su PVP ir beveik neturi lokalių dirginančių savybių, būdingų spirito turintiems jodo preparatams, todėl labiau tinka gydyti odos pažeidimus ir žaizdas.

JP naudojamas tirpalo pavidalu, kuriame yra 1–10 % jodo. Tačiau taip naudojant yra lengvai išplaunamas iš žaizdos ir jo antibakterinis poveikis gerokai sumažėja [17].

Siekiant, kad šio antiseptiko savybės nesumažėtų, jis yra imobilizuojamas į tvarsčio medžiagą. Tvarsčiui kontaktuojant su žaizda, jodas iš lėto atpalaiduojamas, tokiu būdu ji apsaugoma nuo bakterinio užkrato [7].

Šio projekto metu JP buvo imobilizuotas t-HR_D bloko pavidalo karkasuose (žr. 3.2 pav.), siekiant sukurti efektyvesnę, patogesnę JP naudojimo būdą. Suformuoti t-HR_D-JP kompozitų karkasai.

3.6 pav. pateikti natrio hialuronato, t-HR_D ir t-HR_D-JP IR spektrai.



3.6 pav. IR spektrai: t-HA_D-JP (a); natrio hialuronato (b); t-HR_D (c)

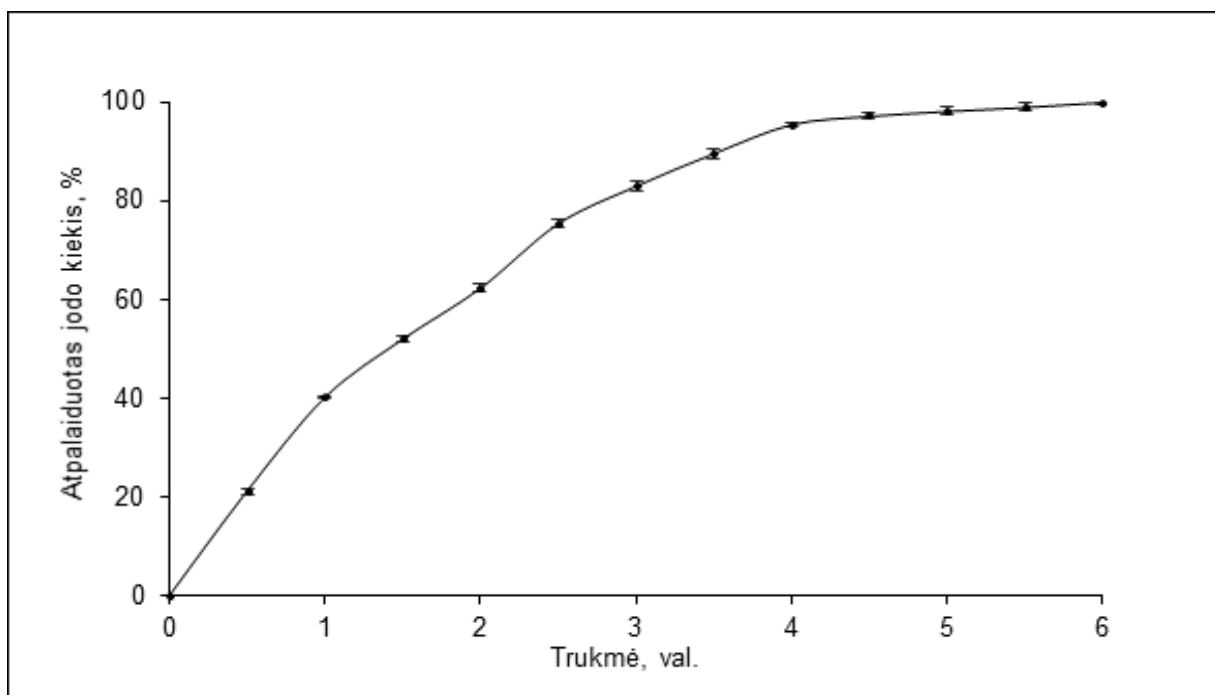
Natrio hialuronato, t-HR_D ir t-HR_D-JP IR spektruose (žr. 3.6 pav., a, b, c) matyti plačios didelio intensyvumo absorbcijos juostos 3650–3200 cm⁻¹ spektro srityje dėl simetrinių valentinių O–H ryšio virpesių. Natrio hialuronato spektre (žr. 3.6 pav., b) ši absorbcijos juosta yra plačiausia, nes yra daugiausiai -OH grupių. Modifikuotos HR spektruose (žr. 3.6 pav. a, c) šios

absorbcijos juostos susiaurėja, nes šarminėje terpėje vyko HR tinklinimo reakcija ir –OH grupių sumažėjo. C-H ryšio valentinių virpesių absorbcijos juostos stebimos 3100–2800 cm^{-1} spektro srityje, deformacinių virpesių – 1360–1470 cm^{-1} spektro srityje. Absorbcijos smailės 1800–1600 cm^{-1} spektro dalyje stebimos dėl C=O grupės buvimo. Natrio hialuronato ir t-HR_D IR spektre šiai grupei būdingos absorbcijos smailės stebimos atitinkamai ties 1625 cm^{-1} ir 1637 cm^{-1} (žr. 3.6 pav., b, c). Šiuos virpesius atitinkanti absorbcijos smailė t-HR_D-JP IR spektre (3.6 pav., a) pasislenka į didesnių bangos skaičių pusę (1670 cm^{-1}) dėl JP imobilizavimo. Suformuotų t-HR_D-JP IR spektre (žr. 3.6 pav., a) matyti deformacinių C-N ryšio virpesių smailė ties 1289 cm^{-1} .

Natrio hialuronato spektre (žr. 3.6 pav., b) asimetrinių valentinių C-O-C virpesių smailė matoma ties 1154 cm^{-1} . Absorbcijos smailė ties 1032 cm^{-1} atsiranda dėl valentinių C-O virpesių. Absorbcijos smailė ties 947 cm^{-1} atitinka C-OH deformacinius svyravimus už plokštumos. Absorbcijos smailės dėl minėtų ryšių virpesių stebimos ir t-HR_D spektre (žr. 3.6 pav., c).

3.2.1.1. Jodo atsipalaidavimo kinetika

Ištirta jodo atsipalaidavimo kinetika iš t-HR_D-JP karkasų (žr. 3.7 pav.).



3.7 pav. Jodo atsipalaidavimo kinetika iš t-HR_D-JP karkasų

Iš gautų rezultatų (žr. 3.7 pav.) matyti, kad jodas atsipalaiduoja iš t-HR_D-JP karkasų tolygiai.

Po 1 val. atsipalaiduoja 40 % jodo. Visiškas jodo atsipalaidavimas iš karkasų buvo pasiektas praėjus 6 val.

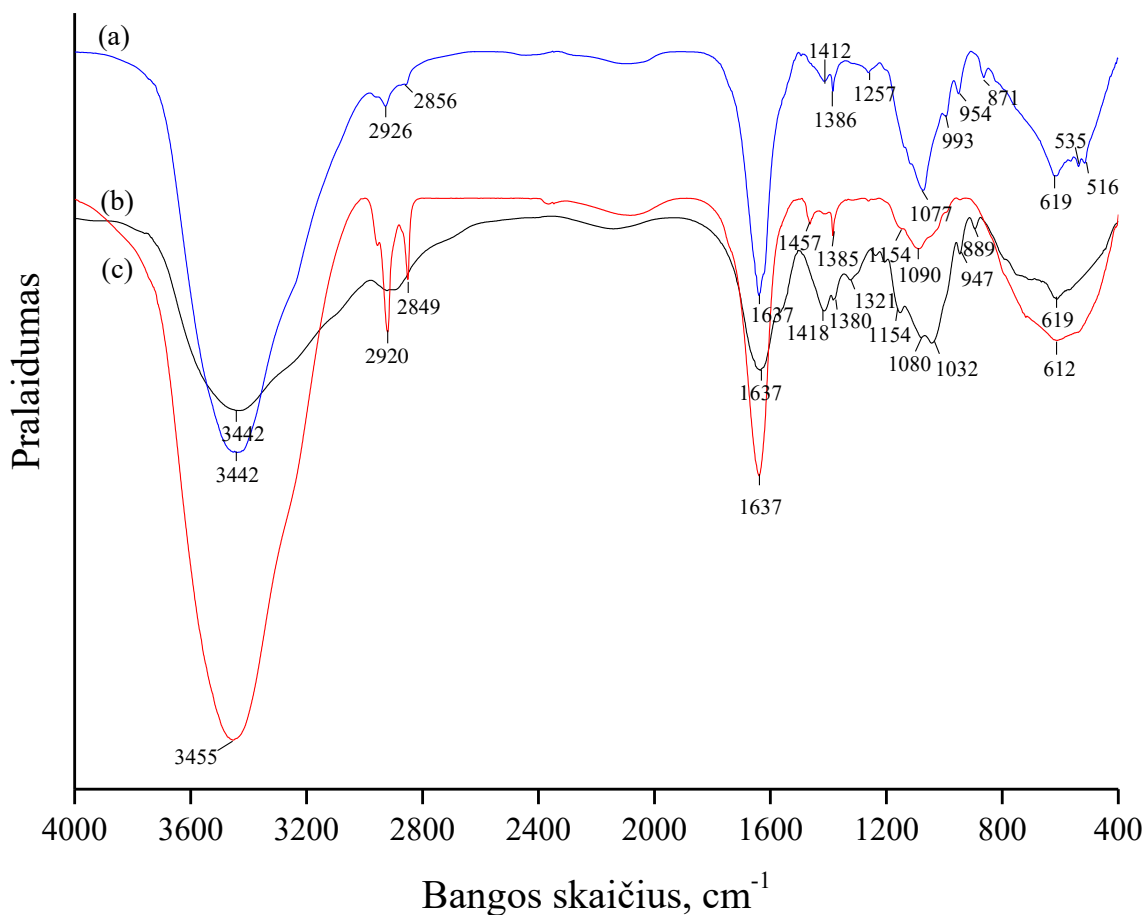
Bloko pavidalo t-HR_D karkasai užtikrina tolygų jodo atsipalaidavimą iš polimerinio karkaso, taip užtikrinant ilgalaikę apsaugą nuo mikroorganizmų.

3.2.2. Tinklintos hialurono rūgšties karkasai su imobilizuotu chlorheksidino digliukonatu

Kitas darbe naudotas antiseptikas – chlorheksidinas. Tai katijoninis biguanidas, dažniausiai naudojamas chlorheksidinio digliukonato (CHD) druskos pavidalu, nes ši druska pasižymi didžiausiu tirpumu. Tai plataus spektro antimikrobinė medžiaga. Mažos koncentracijos CHD tirpalai veikia bakteriostatiškai, o didesnės koncentracijos – bakteriocidiškai, t. y. naikina gram-teigiamas ir gram-neigiamas bakterijas ir kai kuriuos grybelius [25, 54]. Šiuo metu yra plačiai taikomi CHD preparatai yra skirti žaizdoms ir nudegimams gydyti, tačiau norint, kad nepasireikštų anafilaksinė reakcija, jų koncentracija turi neviršyti 0,05 % [55]. Nedidelės koncentracijos chlorheksidino preparatai yra mažai toksiški, gerai toleruojami odos ar gleivinių, todėl jie gana plačiai naudojami: tai burnos skalavimo skysčiai, purškalai, tepalai ar geliai [54, 56]. Daugelis gelių yra naudojami vietiniam chlorheksidino atpalaidavimui gydant periodontitą, esant įvairiems burnos gleivinės uždegimams ar infekcinėms ir dantų ligoms, kadangi yra užtikrinamas pailgintas pastovus vaistinės medžiagos atpalaidavimas [9].

Iš literatūros duomenų [36] yra žinoma, kad CHD antibakterinis aktyvumas sumažėja, kai jis sudaro kompleksą su priešingą krūvį turinčiomis polimerų funkcinėmis grupėmis. Siekiant ištirti suformuotų t-HR_D karkasų tinkamumą žaizdoms gydyti, į bloko pavidalo karkasus buvo imobilizuotas CHD. Be to, siekiant palyginti, t-HR_D karkasai buvo inkliuduojami mažos molekulinės masės HR (HR_M) tirpalu ir tik tuomet imobilizuotas CHD.

3.8 paveiksle pateikti natrio hialuronato, t-HR_D ir t-HR_D-CHD IR spektrai. Suformuotų t-HR_DHR_M-CHD IR absorbcijos smailės persidengia su t-HR_D-CHD būdingomis absorbcijos smailėmis, todėl 3.8 paveiksle pateiktas t-HR_D-CHD karkaso IR spektras.

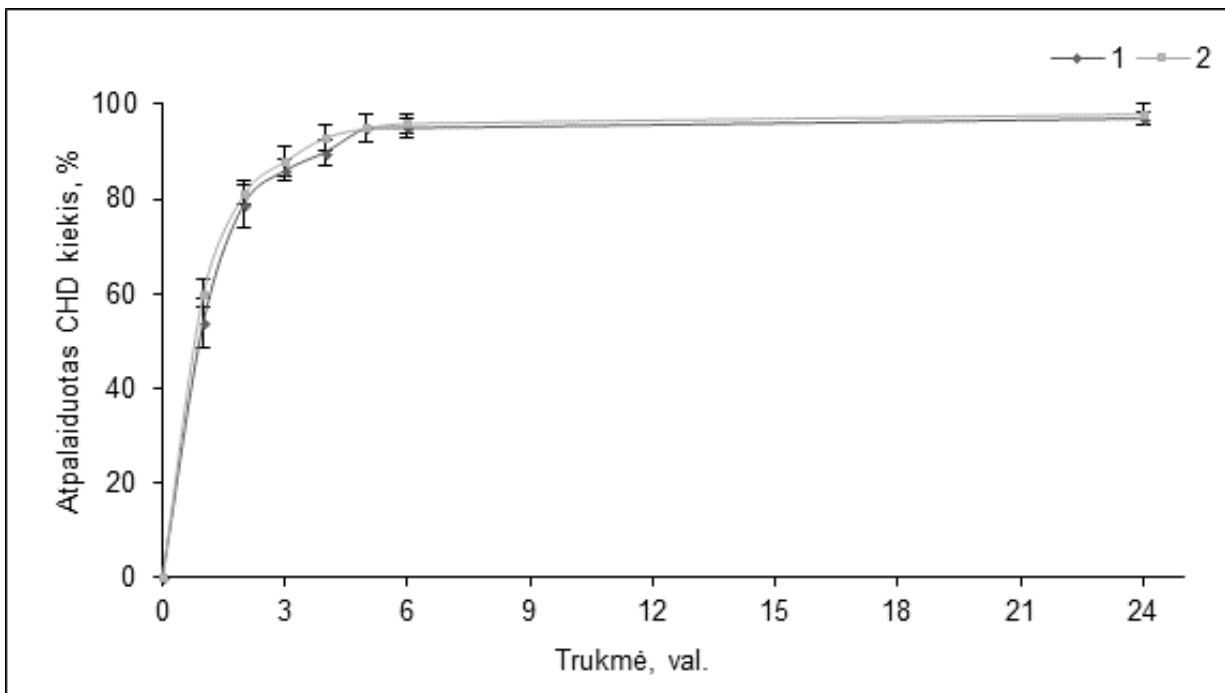


3.8 pav. IR spektrai: t-HA_D-CHD (a); natrio hialuronato (b); t-HR_D (c)

Suformuotų t-HR_D-CHD IR spektruose (žr. 3.8 pav., a) CHD būdingos absorbcijos smailės ties 2947 cm⁻¹, 3325 cm⁻¹ ir 1093 cm⁻¹ (priskirtos C-H, N-H ir C-N) taip pat persidengia su HR būdingomis absorbcijos smailėmis.

3.2.2.1. Chlorheksidino digliukonato atsipalaidavimo iš karkasų kinetika

CHD atsipalaidavimo kinetika buvo tirta iš t-HR_D-CHD ir t-HR_DHR_M-CHD karkasų (žr. 3.9 pav.).



3.9 pav. CHD atsipalaidavimo kinetika iš karkasų: 1 – t-HR_DHR_M-CHD; 2 – t-HR_D-CHD

Iš gautų rezultatų (žr. 3.9 pav.) matyti, kad CHD iš t-HR_D-CHD ir t-HR_DHR_M- karkasų atsipalaiduoja tolygiai. Stebimas nežymus CHD atsipalaidavimo kinetikos iš karkasų skirtumas. CHD iš t-HR_DHR_M-CHD karkasų atsipalaiduoja šiek tiek lėčiau nei iš t-HR_D-CHD.

Iš literatūros duomenų [36] yra žinoma, kad dėl HR karboksigrupių ir CHD aminograpių sąveikos yra sudaromas kompleksas. Galima daryti išvadą, kad t-HR_DHR_M ir CHD sudaro tvirtesnę kompleksinę junginį, iš kurio CHD atplaiduojamas lėčiau.

CHD atsipalaidavimo kinetikos tyrimai parodė, kad iš t-HR_D-CHD karkasų per 24 val. atsipalaiduoja iki $98 \pm 2,6$ % CHD, o iš karkasų su inkliuduota HR_M – $97 \pm 3,1$ %. Tyrimai yra su paklaida, todėl daroma prielaida, kad pasiektas visiškas CHD atpalaidavimas.

3.2.2.2 Antibakterinės karkasų savybės

Siekiant įvertinti t-HR_D-CHD ir t-HR_DHR_M-CHD antibakterines savybes, buvo atlikti mikrobiologiniai tyrimai. Antibakterinis karkasų aktyvumas buvo tiriamas prieš gramteigiamas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) ir gramneigiamas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakterijas. Tyrimų rezultatai pateikti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Antibakterinių savybių tyrimų rezultatai

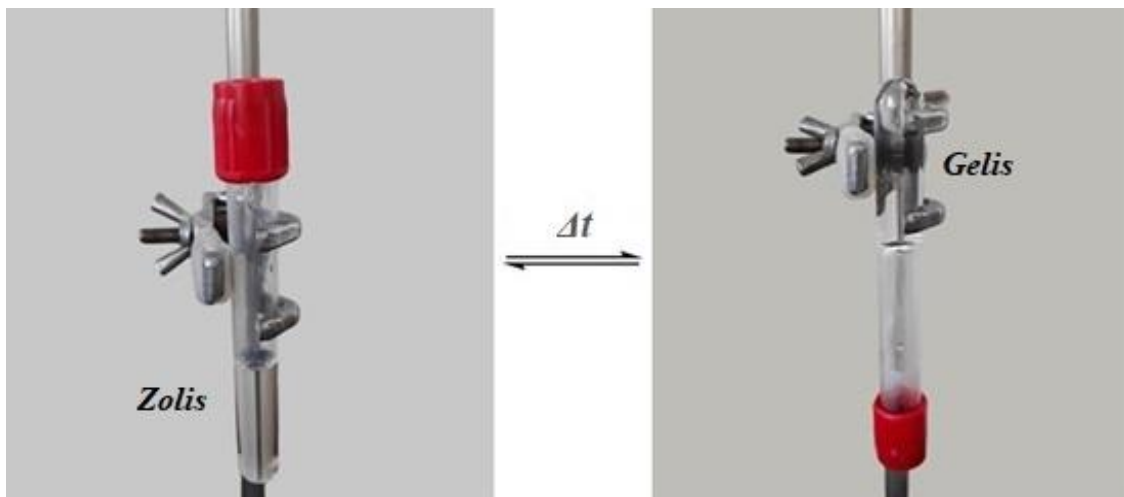
Karkasas	Gramteigiamos bakterijos		Gramneigiamos bakterijos	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Inhibicinė zona, mm			
t-HR _D -CHD	2,1 ± 1,24	2,1 ± 0,22	1,9 ± 0,65	0,9 ± 0,11
t-HR _D HR _M -CHD	1,3 ± 0,25	1,8 ± 0,56	1,5 ± 0,01	0,5 ± 0,35

Iš gautų duomenų, pateiktų 3.1 lentelėje, matyti, kad suformuoti t-HR_D-CHD ir t-HR_DHR_M-CHD pasižymi antibakteriniu poveikiu prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas. Nustatyta, kad t-HR_D-CHD karkasų inhibicinė zona prieš gramteigiamas *Staphylococcus aureus* ir *Staphylococcus epidermidis* bakterijas yra didžiausia ir siekia 2,1 mm. Šių karkasų inhibicinės zonos mažesnės prieš gramneigiamas bakterijas *Escherichia coli* ir *Pseudomonas aeruginosa*. Šios zonos atitinkamai siekia 1,9 mm ir 0,9 mm. Tyrimo rezultatai parodė, kad silpnesniu antibakteriniu poveikiu pasižymi t-HR_DHR_M-CHD karkasai. Galima daryti išvadą, kad HR_M nežymiai sumažina CHD antibakterinį poveikį.

3.2.3. Tinklintos hialurono rūgšties su inkluduotu triblokiniu kopolimero tirpalu savybių tyrimai

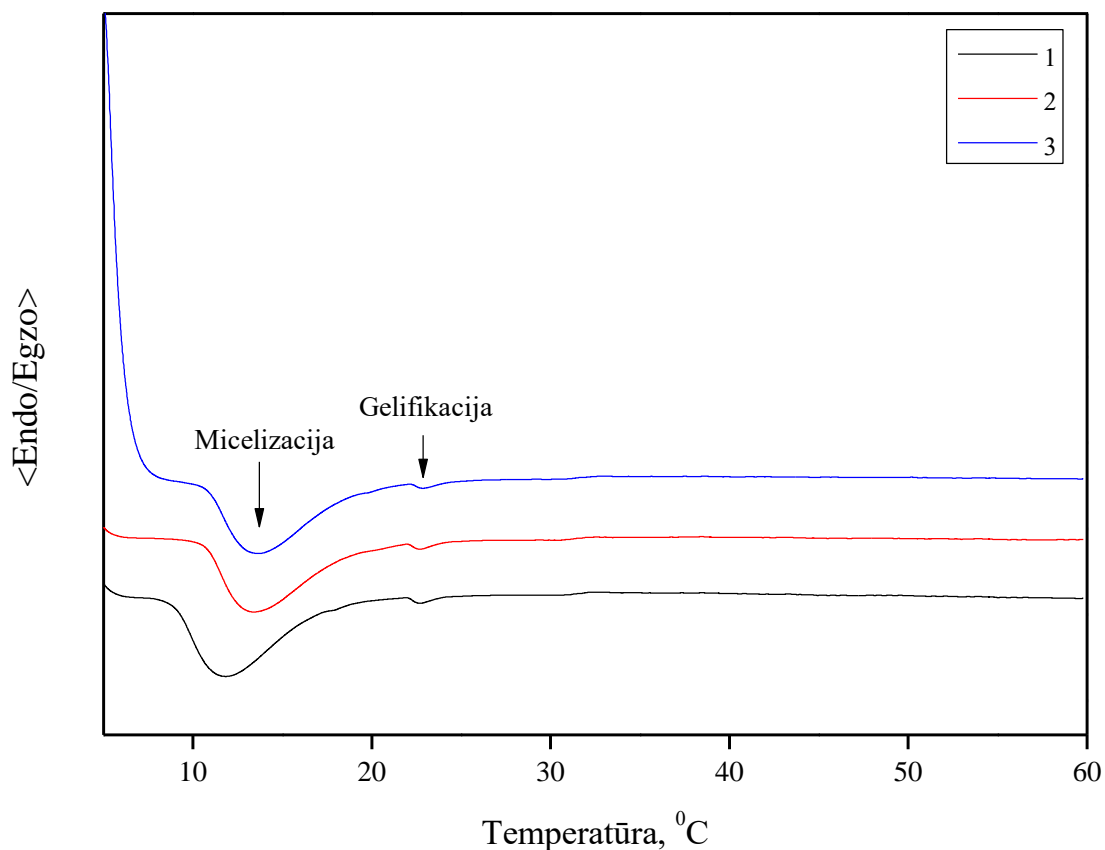
Injekciniai geliai plačiai taikomi audinių regeneracijai. Jų naudojimas suteikia galimybę pasiekti sunkiai pasiekiamas pažeistas kūno vietas. Audinių inžinerijoje ypač yra vertinami geliai, kuriuos galima gauti zolio-gelio metodu. Šie, priklausomai nuo temperatūros, geba formuoti mices – sudaro koloidinius tirpalus [40]. Toliau didinant temperatūrą koloidinis tirpalas dėl micelių agregacijos virsta geliu.

Projekte naudojamas *Pluronic*[®] F-127. Tai triblokinis kopolimeras, kuriam būdingas zolio-gelio virsmas. Kopolimeras pasižymi geru biologiniu suderinamumu, geba sudaryti gelį 37 °C arba žemesnėje temperatūroje, todėl šis kopolimeras yra dažnai naudojamas kaip įvairių aktyviųjų junginių nešiklis [38, 43–44]. Šio kopolimero zolio-gelio virsmas pateiktas 3.10 paveiksle.



3.10 pav. Zolio-gelio virsmas

Projekte buvo tiriama t-HR_D aktytų granulių įtaka triblokiniio kopolimerio micelizacijos ir gelifikacijos temperatūrai (žr. 3.11 pav.). Aktytų granulių koncentracija triblokiniio kopolimerio tirpale buvo 1–1,5 %. Triblokiniio kopolimerio 20 % koncentracijos tirpalas buvo naudotas kaip kontrolė.



3.11 pav. DSK kreivės: 1 – 20 % triblokiniio kopolimerio tirpalas su 1,5 % t-HR_D granulėmis; 2 – 20 % koncentracijos triblokiniio kopolimerio tirpalas; 3 – 20 % triblokiniio kopolimerio tirpalas su 1 % t-HR_D granulėmis

Iš 3.11 paveiksle pateiktų DSK kreivių matyti, kad padidinus temperatūrą atsiranda endoterminė smailė, atspindinti triblokini kopolimero micelizaciją. Toliau didinant temperatūrą, atsiranda smailė, rodanti polimero gelifikacijos temperatūrą. Iš gautų duomenų matyti, kad triblokini kopolimero micelizacija vyksta esant 13,4 °C temperatūrai, o gelifikacija – 22,7 °C temperatūrai (žr. 3.11 pav., 2). Didinant t-HR granulių kiekį kopolimero tirpale, micelizacijos smailės padėtis pasislenka į žemesnės temperatūros pusę (11,8 °C), tačiau gelifikacijos temperatūra beveik nepakinta (22,8 °C) (žr. 3.11 pav., 1). Todėl tolesniems tyrimams atlikti buvo pasirinktas triblokini kopolimero tirpalas, kuriame t-HR_D granulės sudaro 1,5 %.

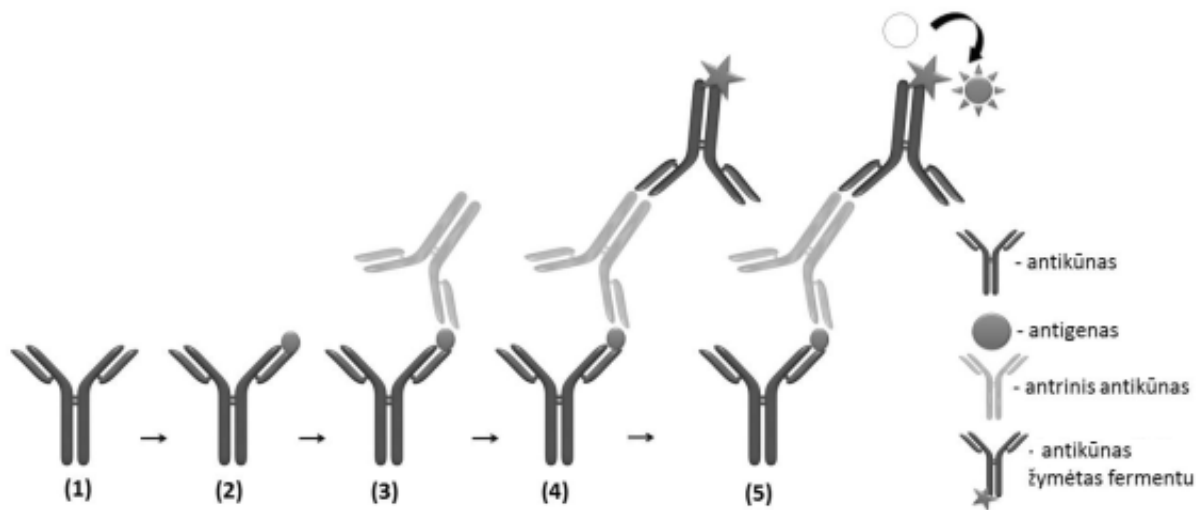
3.2.3.1. Hialurono rūgšties granulės su triblokiniu kopolimeru ir fibroblastų augimo faktoriaumi

Žaizdos gijimui būdingi keturi etapai: uždegimo, granuliacijos, epitelizacijos ir rando brendimo. Visų šių etapų procesai yra vienodi esant bet kokios rūšies žaizdoms, todėl žaizdos turėtų vienodai ir gyti. Tačiau iš klinikinės praktikos žinoma, kad vienos žaizdos gyja greičiau, kitos – labai ilgai, t. y. mėnesius ar net keletą metų [57]. Nuolat yra ieškoma būdų, kaip paspartinti žaizdos gijimą. Yra žinoma [58], kad vieni iš pagrindinių veiksnių, skatinančių žaizdos gijimą, yra augimo faktoriai. Tai polipeptido molekulės, kurios išsiskiria audiniams regeneruojant, tačiau kai kuriais žaizdos gijimo atvejais, pavyzdžiui, esant sutrikusiai audinių kraujotakai, dėl fiziologinio amžiaus, sergant cukriniu diabetu ir kt., gali būti išskirtas nepakankamas jų kiekis. Žaizdos gijimo procese taip pat dalyvauja įvairios ląstelės – trombocitai, leukocitai, fibroblastai. Sutrikus jų migracijai į žaizdą, gijimas taip pat sutrinka [59, 60]. Todėl siekiant paskatinti žaizdos gijimą, įvairiais jos gijimo laikotarpiais gali būti naudojami augimo faktoriai.

Šiame projekte t-HR_D granulės buvo inkliuduojamos triblokini kopolimero tirpalu ar fosfatiniu buferiu ir imobilizuojamas fibroblastų augimo faktorius (FGF), kuris skatina minkštųjų audinių regeneraciją [59, 61].

3.2.3.2. Fibroblastų augimo faktoriaus atsipalaidavimo kinetika

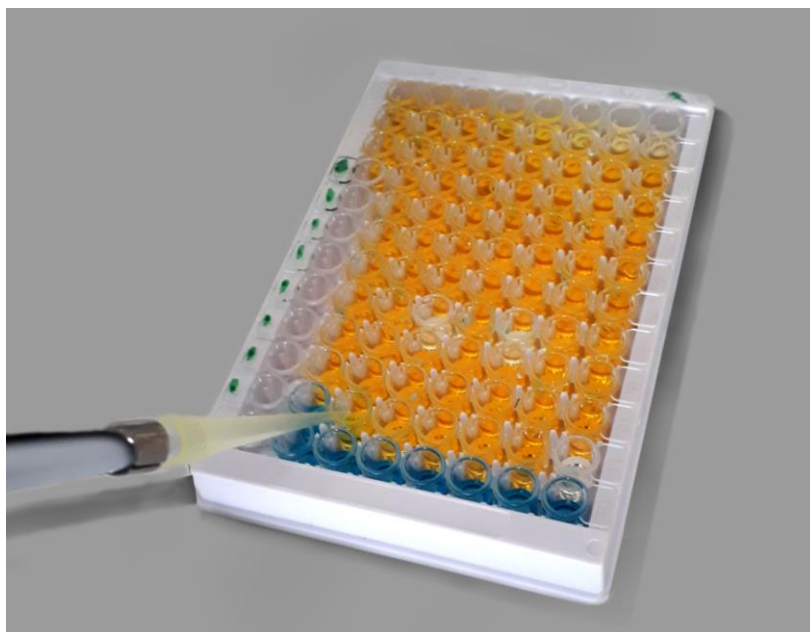
Imunofermetinė analizė (ELISA) – tai tyrimo metodas, pagrįstas antikūno-antigeno komplekso susidarymu ir fermentu pažymėtų antikūnų naudojimu. ELISA schema pateikta 3.12 paveiksle.



3.12 pav. Principinė ELISA schema: ant plokštelės imobilizuoti pirminiai antikūnai (1); antikūno ir antigeno sąveika (2); antigeno sąveika su antriniais antikūnais (3); antrinių antikūnų sąveika su antikūnais, žymėtais fermentu (4); fermentinės reakcijos analizinio signalo registravimas (5)¹⁰

Plokštelės šulinėliai yra padengti pirminiais monokloniniais antikūnais, specifiniais FGF. Metodo pagrindą sudaro antikūno-antigeno reakcija. Tiriama mėginiai įpilami į šulinėlius. Kai tiriamajame mėginyje yra FGF, reakcijos metu susidaro antikūno-antigeno kompleksas, kuris lieka prisijungęs prie šulinėlių sienelių. Neprisijungusios medžiagos yra išplaunamos. Tuomet įpilamas fermentu žymėto antikūno tirpalas. Antikūnas reaguoja su prisijungusiu antigenu. Neprisijungę fermentu žymėti antikūnai yra išplaunami. Po to į šulinėlius įpilamas tetrametilbenzidinas – fermento peroksidazės substratas, kuris paveiktas fermento keičia mėlyną spalvą į geltoną, t. y. fermentas skaldo chromogeninį substratą (žr. 3.13 pav.). Spalvos intensyvumas yra proporcingas antikūnų koncentracijai mėginyje [49].

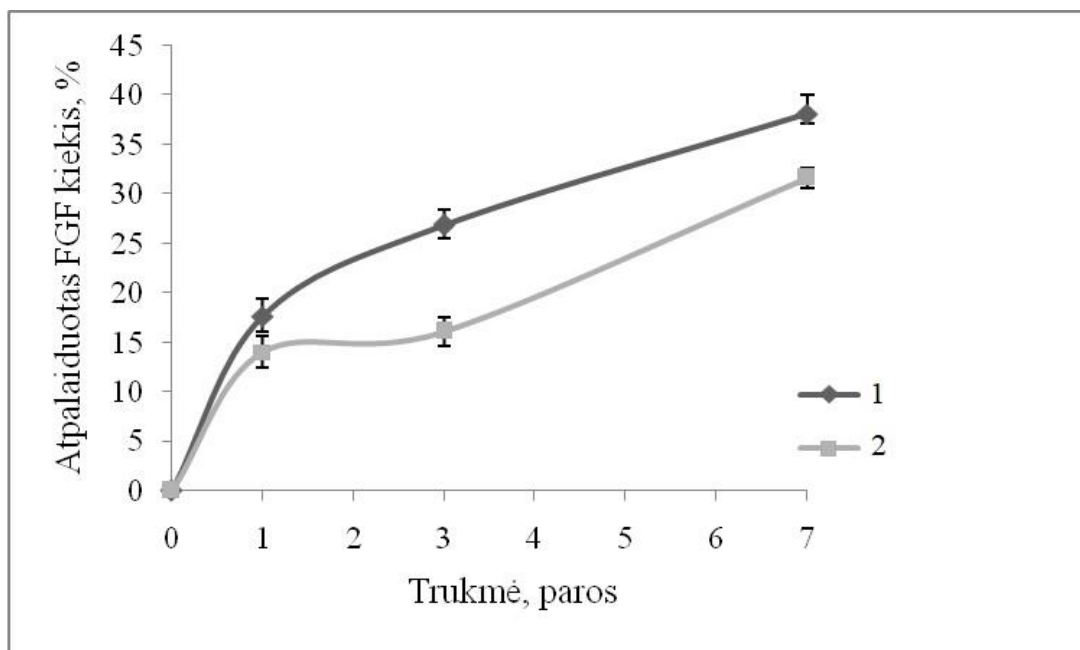
¹⁰ RUKŠNAITĖ, J. 2016. Paviršiaus plazmonų rezonanso ir elektrocheminiai imuniniai jutkliai žmogaus augimo hormono ir antikūnų prieš žmogaus augimo hormoną nustatymui (rankraštis). Fiziniai mokslai, chemija (03P). Vilniaus universitetas, Vilnius.



3.13 pav. Fermentinė reakcija

Mėginių šviesos sugertis matuojama spektrofotometru, bangos ilgiui esant 450 nm.

FGF atsipalaidavimo kinetika buvo tirta iš t-HR_D granulių, inkliuduotų fosfatiniu ar triblokiniu kopolimero tirpalais (žr. 3.14 pav.).



3.14 pav. FGF atsipalaidavimo kinetika iš t-HR_D granulių, inkliuduotų fosfatiniu buferiniu tirpalu (1) ar triblokiniu kopolimero tirpalu (2)

Iš 3.14 paveiksle pateikto grafiko matyti, kad iš t-HR_D granulių, inkliuduotų triblokiniu kopolimero tirpalu, praėjus 1 parai atpalaiduojama apie 14 % FGF, po 3 parų pastebimas

nežymus FGF padidėjimas (16 %). Po 7 parų išsiskyres augimo faktoriaus kiekis siekia 32 %. Iš t-HR_D granulių, inkliuduotų fosfatinu buferiniu tirpalu, stebimas tolygiai didėjantis FGF atsipalaidavimas – po 1 paros jo kiekis siekia 17 %, po 3 – 27 %, praėjus 7 paroms – 38 %.

Remiantis gautais duomenimis, galima daryti išvadą, kad inkliuduojant t-HR_D granules triblokiniio kopolimero tirpalu, formuojasi gelis, todėl yra sulėtinamas FGF išskyrimas.

IŠVADOS

1. Suformuoti hialurono rūgšties granulių ir bloko pavidalo karkasai, kurie pagal savo morfologiją yra tinkami minkštųjų audinių regeneracijai. Nustatyta, kad 1 g karkaso geba sorbuoti $76 \pm 0,6$ g fosfatinio buferinio tirpalo, o 1 g aktyvų granulių – $29 \pm 1,7$ g.
2. Suformuoti hialurono rūgšties bloko pavidalo karkasai su imobilizuotu joduotu povidonu. Nustatyta, kad visiškas jodo atpalaidavimas iš bloko pavidalo karkasų pasiekiamas po 6 valandų.
3. Suformuoti hialurono rūgšties bloko pavidalo karkasai su imobilizuotu chlorheksidino digliukonatu. Nustatyta, kad po 24 valandų atpalaiduoto chlorheksidino digliukonato kiekis iš karkasų siekia 100 %. Nustatyta, kad karkasai su imobilizuotu chlorheksidino digliukonatu pasižymi antibakteriniu aktyvumu prieš *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ir *Pseudomonas aeruginosa* bakterijas.
4. Suformuotos hialurono rūgšties granulės su triblokiniu kopolimeru ir fibroblastų augimo faktoriumi. Ištirta triblokinio kopolimero įtaka augimo faktoriaus atsipalaidavimo kinetikai. Tyrimais *in vitro* nustatyta, kad triblokinis kopolimeras pailgina fibroblastų augimo faktoriaus atpalaidavimą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. KRETLOW J. D. and A. G. MIKOS, From material to tissue: Biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering. *AIChE Journal*. 2008, 54, 3048–3067. ISSN 1547-5905.
2. LEONG, K. F., C. M. CHEAH and C. K. CHUA. Solid free form fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*. 2003, 24, 2363–2378. ISSN 0142-9612.
3. TAI, H. et al. Control of tissue engineering scaffold structure. *European Cells and Materials*. 2007, 14, 64–77. ISSN 1473-2262.
4. LEONG, K. F., C. M. CHEAH and C. K. CHUA. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*. 2003, 24, 2363–2378.
5. BOSS, E. A., R. M. FILHO and E. C. V. TOLEDO. Freeze drying process: real time model and optimization. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2004, 43, 1475–1485.
6. WESKA, R. F. et al. Effect of freezing methods on the properties of lyophilized porous silk fibroin membranes. *Materials Research*. 2009, 12, 233–237. ISSN 0025-5408.
7. LIAKOS, I. et al. Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads. *Carbohydrate polymers*. 2013, 92, 176–183. ISSN 0144-8617.
8. BOONKAEW, B. et al. Antimicrobial efficacy of a novel silver hydrogel dressing compared to two common silver burn wound dressings: Acticoat™ and PolyMem Silver®. *Burns*. 2014, 40, 89–96. ISSN 0305-4179.
9. FINI, A., V. BERGAMANTE and C. CESCHEL. Mucoadhesive gels designed for the controlled release of chlorhexidine in the oral cavity. *Pharmaceutics*. 2011, 3, 665–679.
10. O'BRIEN, F. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011, 14, 88–95, ISSN 1369-7021.
11. GUO, B. and PETER X. MA. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Recent Research Progress of Biomedical Polymers*. 2014, 57, 490–500. ISSN 1674-7291.
12. CHEN, M., M. CHOPRA and S. BHOWMICK. The use of electrospun polycaprolactone as a dermal scaffold for skin tissue engineering. *MRS Proceedings*. 2009, 1235, 1235-RR05-04.

13. WANG, Q. et al. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers*. 2010, 82, 842–847. ISSN 0144-8617.
14. FENG, Y. et al. Alginate gels with a combination of calcium and chitosan oligomer mixtures as crosslinkers. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 156, 491. ISSN 0144-8617.
15. BLAIR, S. D, P. JARVIS, M. SALMON and C. MCCOLLUM. Clinical trial of calcium alginate haemostatic swabs. *British Journal of Surgery*. 1990, 77, 568–570.
16. ANDERSEN, T. et al. Ionically gelled alginate foams: physical properties controlled by type, amount and source of gelling ions. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 99, 249–256. ISSN 0144-8617.
17. BALIN, A. K., et al. Dilute povidone-iodine solutions inhibit human skin fibroblast growth. *Dermatologic Surgery*. 2002, 28, 210–214. ISSN 1076-0512.
18. KISELIOVIENĖ, S. 2016. Celiuliozės hidrogelių, skirtų žaizdų tvarsčiams, gavimas ir tyrimas: daktaro disertacija (rankraštis). Fiziniai mokslai, chemija (03P). Kauno technologijos universitetas, Kaunas.
19. DAI, T. et al. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2012, 9, 857–879. ISSN 1478-7210.
20. PARHI, R. Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: a review. *Advanced pharmaceutical Bulletin*. 2017, 7, 515–530. ISSN 2228-5881.
21. CHIA-FEN, L. et al. Morphology and temperature responsiveness – swelling relationship of poly(N-isopropylamide-chitosan) copolymers and their application to drug release. *Journal of Polymer Science*. 2004, 42, 3023–2029. ISSN 1099-0518.
22. SENEL, S. et al. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000, 193, 197–203. ISSN 0378-5173.
23. ALSARRA, A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2009, 45, 16–21. ISSN 0141-8130.
24. YAN, J. Potential use of collagen-chitosan-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2006, 34, 27–39. ISSN 1532-4184.
25. ZENG, P. et al. Concentration dependent aggregation properties of chlorhexidine salts. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, 367, 73–78. ISSN 0378-5173.
26. RATA, D. M. et al. Hydrogels based on natural polymers with possible application in the treatment of periodontitis. *International Journals of Medical Dentistry*. 2014, 4, 265–270.
27. PAPAKONSTANTINOUS E., M. ROTH and G. KARAKIULAKIS. Hyaluronic acid: a key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol*. 2012, 4, 253–258. ISSN 2066-6063.

28. OH, J. H. et al. Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin *in vivo*. *Experimental Dermatology*. 2011, 20, 445–456.
29. SHU, X., Y. LIU and Y. LUO. Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules*. 2002, 3, 1304–1311. ISSN 1525-7797.
30. SVIDROŇOVÁ, B. *Crosslinking of polysaccharide microfibers*. Brno university of technology. 2014.
31. SEGURA, T. et al. Cross-linked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials*. 2015, 26, 359–371. ISSN 0142-9612.
32. GATTA, A. L. et al. Hyaluronan scaffolds via diglycidyl ether cross-linking: Toward improvements in composition and performance. *Carbohydrate Polymers*. 2013, 96, 536–544. ISSN 0144-8617.
33. CAILLARD, R., G. REMONDETTO, M. MATESSCU, and M. SUBIRADE. Characterization of amino cross-linked soy protein hydrogels. *Journal of Food Science*. 2008, 73(5), 283-291.
34. LAI, J. Relationship between structure and cytocompatibility of divinyl sulfone crosslinked hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 101, 203-212
35. HENNIK, W.E. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, 64, 223-236.
36. ROSSI, S. et al. Wound dressings based on chitosans and hyaluronic acid for the release of chlorhexidine diacetate in skin ulcer therapy. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2007, 12, 415–422. ISSN 1083-7450.
37. COHN, D., A. SOSNIK and A. LEVY. Improved reverse thermo-responsive polymeric systems. *Biomaterials*. 2003, 24, 3703–3714. ISSN 0142-9612.
38. JEONG, B., S. W. Kim and Y. H. BAE. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, 64, 154–162. ISSN 0169-409X.
39. DUMORTIER G. et. al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research*. 2006, 23, 2709–2728. ISSN 0724-8741.
40. ESCOBAR-CHAVEZ J. J. et al. A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2006, 9, 339–358. ISSN 1482-1826.
41. GUTOWSKA, A., J. BYEONGMOON and M. JASIONOWSKI. Injectable gels for tissue engineering. *The Anatomical Record*. 2001, 263, 342–349. ISSN 1932-8486.

42. KRETLOW, J. D., L. KLOUDA and A. MIKOS. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery. Reviews.* 2007, 59, 263. ISSN 0169-409X.
43. HIRATA, A. N. and M. L. BRUSCHI. Development and characterisation of semisolid systems to deliver propolis in the oral cavity. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.* 2010, 31, 33–39. ISSN 2179-443X.
44. ALMEIDA, H. et al. Pluronic F-127 and pluronic lecithin organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2012, 15, 592–605. ISSN 1482-1826.
45. MAZURKEVIČIŪTĖ, A. ir kt. Modelling and biopharmaceutical evaluation of ciclopirox olamine gels. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* 2017, 74, 543–549. ISSN 2353-5288.
46. HEILMANN, S. et al. A thermosensitive morphine-containing hydrogel for the treatment of large-scale skin wounds. *International Journal of Pharmaceutics.* 2013, 444, 96–102. ISSN 0378-5173.
47. CAFAGGI, S. et al. Poloxamer 407 as a solubilising agent for tolfenamic acid and as a base for a gel formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2008, 35, 19–29. ISSN 0928-0987.
48. JUNG, Y. S. Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. *Carbohydrate polymers.* 2017, 20, 403–408. ISSN 0144-8617.
49. Human FGF basic ELISA Kit [interaktyvus] [žiūrėta 2018-04-18]. Prieiga per internetą: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0004008_KHG0021_KHG0022_Hu_FGF_ELISA_PI.pdf
50. Freeze drying [interaktyvus] [žiūrėta 2018-05-02]. Prieiga per internetą: <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics/>
51. GAIDEMAUSKAITĖ, J. 2018. Injekciniai kaulo pakaitalai: baigiamasis bakalauro projektas (rankraštis). Fiziniai mokslai, chemija (03P). Kauno technologijos universitetas, Kaunas.
52. HELLER, J., S. H. PANGUM and D. W. H. PENHALE. Use of bioerodible polymers in self-regulated drug delivery systems. *ACS Symposium Series.* 1987, 348, 172–187. ISSN 0097-6156.
53. JAGUR-GRODZINSKI, J. Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. *Polymers Advanced Technologies.* 2010, 21, 27–47.

54. BARBOUR, M. E. et al. Synthesis, characterization, and efficacy of antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles for applications in biomedical materials and consumer products. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, 8, 3507–3519. ISSN 1176-9114.
55. LIN, S. C. et al. Formulation and stability of an extemporaneous 0.02% chlorhexidine digluconate ophthalmic solution. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2015, 114, 1162–1169. ISSN 0929-6646.
56. ZONG, Z. and L. E. KIRSCH. Studies on the stability of chlorhexidine, Part I: kinetics and mechanisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, 101, 2417–2427. ISSN 0022-3549.
57. THOMAS, D. W. AND K. G. HARDING. Wound healing. *British Journal of Surgery*. 2002, 89, 1203–1205. ISSN 1365-2168.
58. GALIACY, S. et al. Keratinocyte growth factor promotes cell motility during alveolar epithelial repair in vitro. *Experimental Cell Research*. 2003, 283, 215–229. ISSN 0014-4827.
59. LERMAN, O. Z. et al. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *American Journal of Pathology*. 2003, 162, 303–312. ISSN 0002-9440.
60. BLACK, E. et al. Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemic control. *Archives of Surgery*. 2003, 138, 34–40. ISSN 1435-2443.
61. JORGENSEN, L. N. et al. Dose-dependent impairment of collagen deposition by topical granulocyte-macrophage colony – stimulating factor in human experimental wounds. *Annals of Surgery*. 2002, 236, 684–692. ISSN 0003-4932.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Baniukaitienė, Odeta; **Mintaučkaitė, Dalia**; Kutraitė, Rimantė; Gaidemauskaitė, Jūratė; Ščiupakovaitė, Lina; Narauskaitė, Deimantė; Stravinskaitė, Marija. Injectable biomaterials for bone tissue regeneration // ESB 2017: 28th annual conference of the European Society for Biomaterials (ESB) "Translational activities for exploiting research on biomaterials", September 4-8, 2017, Athens, Greece: book of abstracts. [S.l.]: [s.n.], 2017. p. 798.