

Polimerowe nośniki czynników angiogennych. Cz. I. Membrana chitozanowo-alginianowa jako nośnik PDGF-AB i TGF- β

MARTA MICHALSKA¹, MARCIN KOZAKIEWICZ², KAZIMIERA HENRYKA BODEK³

¹Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biochemii, Zakład Biochemii Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Klinika Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej i
Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

³Katedra Farmacji Stosowanej, Zakład Farmacji Aptecznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Mikrokrystaliczny chitozan (MKCh) charakteryzuje się wieloma cennymi własnościami użytkowymi m. in.: biogodnością, działaniem przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym, wysoką adhezyjnością, wysoką wartością współczynnika WRV i dużą sorpcyjnością, wysoką bioaktywnością, zdolnością do biodegradacji, brakiem oddziaływania cytotoksycznego i immunologicznego, a dodatkowo zdolnością do tworzenia błon bezpośrednio z zawiesiny wodnej. Biopolimer ten ze względu na biodegradację i bezpieczeństwo w stosowaniu, oceniony został jako efektywny czynnik hemostatyczny.

MKCh z takimi właściwościami stanowi przydatny materiał wyjściowy do produkcji opatrunków biologicznych, a przede wszystkim jako nośnik czynników wzrostu, mający zastosowanie w chirurgii. Biodegradowalne membrany są stosowane w chirurgii stomatologicznej do sterowanej regeneracji tkanek, co spowodowało opracowanie technologii otrzymywania modyfikowanych membran z mikrokrystalicznego chitozanu.

Przeprowadzono badania stopnia uwalniania wybranych czynników angiogennych: płytkowego czynnika wzrostu, PDGF-AB i transormującego czynnika wzrostu, TGF- β z dwuwarstwowej membrany chitozanowo-alginianowej, znajdującej zastosowanie w chirurgii

stomatologicznej. Ocena stopnia uwalniania czynników angiogennych (PDGF-AB i TGF- β) w czasie z podłoża polimerowego, może stać się przydatną w wyborze odpowiedniego nośnika dla czynników wzrostu.

Słowa kluczowe: czynniki wzrostu (PDGF-AB, TGF- β), polimery (chitozan mikrokrystaliczny, alginian wapnia), membrana chitozanowo-alginianowa, szybkość uwalniania

WPROWADZENIE

Angiogenne czynniki wzrostu mogą znacznie wspomagać i modyfikować regenerację tkanki [1, 2]. Główną rolę w tym procesie odgrywają czynniki uwalniane z osocza bogatopłytkowego (platelet rich plasma, PRP). Badania nad osoczem bogatopłytkowym pozwoliły zidentyfikować płytkowy czynnik wzrostu (platelet derived growth factor, PDGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin growth factor, IGF), naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor, EGF) oraz transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor, TGF). Płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) pobudza mitogenezę komórek macierzystych szpiku i osteoblastów, powodując zwiększenie ich ilości o kilka rzędów wielkości. Nasila się przy jego udziale mitozą komórek śródbłónka, rozpoczyna się proces angiogenezy i wrastanie naczyń do uszkodzonej tkanki. TGF- β pobudza wzrost fibroblastów, nasila syntezę macierzy kolagenowej i podtrzymuje proces angiogenezy.

Zainicjowanie wzrostu komórek kostnych odbywa się głównie przy udziale czynników PDGF, TGF- β i IGF. Ich źródłem jest głównie osocze bogatopłytkowe (platelet rich plasma, PRP), które znajduje zastosowanie m. in. jako składnik żelu bogatopłytkowego (platelet rich gel, PRG). Aby w pełni wykorzystać właściwości regeneracyjne PRG zastosowano jego połączenie z materiałem osteokondukcyjnym, w wyniku czego uzyskano demineralizowaną macierz kostną stosowaną do regeneracji ubytków kostnych [3].

Z ostatnich badań wynika, że płytki krwi mają zdolność sekrecji dużych stężeń płytkowego czynnika wzrostu (PDGF-AB) i transformującego czynnika wzrostu (TGF- β) [4, 5]. Oceniono aktywność nowo wytworzonej trójwarstwowej błony barierowej alginianowo-chitozanowo-alginianowej, na zmiany stężenia PDGF-AB i TGF- β we własnopochodnym

osoczu bogato płytkowym. Nowa trójwarstwowa błona dla sterowanej regeneracji tkanek, stabilizuje aktywność osteoindukcyjną PRP poprzez protekcyjny wpływ w stosunku do uwalniania PDGF-AB i TGF- β z płytek krwi.

Współczesne metody leczenia wykorzystują możliwości inżynierii tkankowej (biomimetykę), pozwalającą na powtórzenie procesów embriogenetycznych w gojeniu się tkanek [6]. Do przebiegu właściwej regeneracji tkanek wymagane są trzy składniki w pełni od siebie zależne: nośniki, komórki oraz składniki zewnątrzkomórkowe macierzy (ECM) obejmujące czynniki wzrostowe, morfogeny, adhezyny, hormony i witaminy.

Dobrym nośnikiem substancji leczniczych i czynników wzrostu [7, 8] jest chitozan, naturalny polimer wykorzystywany do projektowania sztucznych narządów [9]. Prowadzone badania pozwoliły zastosować chitozan dla celów inżynierii tkankowej jako „biologiczne rusztowanie” – podłoże do hodowli komórek [10]. Eksperymentalne badania wskazują na możliwość wykorzystania chitozanu jako „biologicznego kleju”, który mógłby z powodzeniem znaleźć zastosowanie w uszkodzeniach tkanki kostnej oraz krwawieniach z dużych naczyń krwionośnych [11]. Jednym z wielu materiałów używanych w chirurgii jest żel fibrynowy (fibrin glue) [12]. Związany z endothelialnym czynnikiem wzrostu (endothelial cell growth factor, ECGF), stanowi dobry hemostatyczny materiał opatrunkowy. W badaniach *in vitro* okazało się, że żel fibrynowy w połączeniu z kwasem hialuronowym i z siarczanem chondroityny (GHC6S), jest doskonałym czynnikiem promującym reakcję sekrecji komórek matrix mitochondrialnego oraz hamującym procesy ich degradacji [13, 14]. Zarówno składnik badanego kompleksu, jak i jego usieciowanie, mają znaczący wpływ na stopień uwalniania czynników wzrostu.

Wciąż trwają poszukiwania nowych materiałów do tworzenia membran dla sterowanej regeneracji tkanek. W prezentowanej pracy przedstawiono sposób otrzymania dwuwarstwowej membrany z mieszaniny polimerów naturalnych: chitozanu mikrokrystalicznego i alginianu wapnia, oraz wstępną ocenę właściwości otrzymanej membrany do wiązania i uwalniania wybranych czynników wzrostu.

Celem badań była ocena stopnia uwalniania wybranych czynników wzrostu (PDGF-AB i TGF- β) z podłoża polimerowego (dwuwarstwowej membrany chitozanowo-alginianowej).

MATERIAŁ I METODY

Chitozan mikrokrystaliczny (MKCh M-66) w postaci hydrożelu o zawartości 2,83% polimeru, stopniu deacetylacji ok. 80% i wiskozymetrycznie średniej masie cząsteczkowej ok. 200 kDa oraz alginian wapnia (ALG LF 10/60) w postaci 0,5% zawiesiny wodnej (Instytut Biopolimerów i Włókien Chemicznych, Łódź).

Fizykochemiczna modyfikacja powodująca „uszlachetnienie” chitozanu, pozwoliła na opracowanie chitozanu mikrokrystalicznego. Sposób jego produkcji jest chroniony międzynarodowymi patentami, należącymi do Instytutu Biopolimerów i Włókien Chemicznych w Łodzi. W procesie tym wykorzystuje się zjawiska fizykochemiczne i chemiczne, takie jak zobojętnianie, koagulacja, czy agregacja cząsteczek glukozoaminy. MKCh charakteryzuje się wieloma cennymi własnościami użytkowymi m.in. biogodnością, działaniem przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym, wysoką adhezyjnością, wysoką wartością współczynnika WRV, dużą sorpcyjnością i wysoką bioaktywnością.

Preparatyka filmów polimerowych

Dwuwarstwowe filmy polimerowe chitozanowo-alginianowe (MKCh-ALG) przygotowano przez wylewanie mieszaniny hydrożelu MKCh (ok. 4,0 g) i zawiesiny alginianu wapnia (ok. 2,0 g) z dodatkiem 1 kropli glicerolu (0,03 g) i 2 kropli glikolu propylenowego (0,05 g), na czyste płytki teflonowe o wymiarach 5 cm × 6 cm. Następnie płytki wraz z naniesioną warstwą mieszaniny polimerów suszono 24 h w temperaturze pokojowej. Na tak przygotowane filmy nanoszono w warunkach aseptycznych następną warstwę mieszaniny polimerów (ok. 6,0 g) i plastyfikatorów (ok. 0,08 g). W czasie mieszania składników wprowadzano odpowiedni czynnik wzrostu o ustalonym stężeniu (100 µl roztworu uzyskanego przez rozpuszczenie 10 µg PDGF-AB w 1,11 ml 0,1 mol/l PBS, pH 7,4 i 5 µg TGF-β w 3,921 ml PBS). Stosunek ilościowy PDGF do TGF odpowiada stosunkowi tych oligopeptydów w ludzkim PRP [5].

Płytki z naniesioną drugą warstwą mieszaniny suszono w temperaturze pokojowej przez 24 h. Po odparowaniu wody z hydrożelu otrzymano kserożel chitozanowo-alginianowy, przy czym wagowo chitozan stanowił 92%, a alginian 8% mieszaniny. Tak przygotowane filmy dzielono na kawałki o wymiarach 1 cm × 1 cm, które eluowano do buforu PBS 0,1 mol/l, pH 7,4. W eluencie oznaczano czynnik wzrostu po 30 minutach, 1 h, 2 h, 3h i 5 h.

Analizę wiązania i uwalniania czynników wzrostu przeprowadzono immunoenzymatyczną metodą Elisa.

Oznaczenie ilości związanego z nośnikiem płytkowego czynnika wzrostu (PDGF-AB) i transormującego czynnika wzrostu (TGF- β), przeprowadzono metodą immunoenzymatyczną stosując testy ELISA R&D System Reagent, zawierającego poliklonalne przeciwciała przeciwko PDGF-AB połączone z chrzanową peroksydazą (PDGF-AB Conjugate) i rekombinowanym ludzkim PDGF-AB w buforowanym białku (PDGF-AB Standard). Monoklonalne przeciwciała dla PDGF-AB i TGF- β przeniesiono na mikropłytkę. Wzorzec i próby były unieruchamiane przez odpowiednie przeciwciała.

Rekombinowany TGF- β , 25,0 kDa (Serotec, Immunological Excellence), rekombinowany PDGF-AB, 25,5 kDa (Chemicon® International a Serological Company), Elisa Test by R& D System. Odczytu absorbancji przy 540 nm dokonywano przy użyciu czytnika Elx 800, Bio-Tek Instruments, Inc. Wartości średniej i odchylenie standardowe obliczono korzystając z arkusza kalkulacyjnego Excel pakietu Office 2007 Firmy Microsoft. Stężenie uwolnionych czynników wzrostu w czasie trwania procesu przedstawiono w tabelach i na rycinie.

WYNIKI I DYSKUSJA

Związki wielkocząsteczkowe znajdują coraz szersze zastosowanie w praktyce farmaceutycznej jako substancje pomocnicze, zarówno w technologii nowych postaci leków, jak i w docelowych systemach terapeutycznych z kontrolowanym uwalnianiem substancji leczniczych [15]. Układ substancja lecznicza – polimer umożliwia bowiem lepsze wykorzystanie i zmniejszenie dawek, ograniczenie działań niepożądanych i uproszczenie sposobu podawania leków.

Różnego rodzaju polimery naturalne: polisacharydy – dekstran, kwas hialuronowy, celuloza, chityna, polimery białkowe – albuminy, żelatyna i polimery syntetyczne – alkohol poliwinylowy oraz produkty ich modyfikacji, wykorzystuje się jako polimerowe nośniki leków [16]. Polimery naturalne oraz ich pochodne stanowią cenny materiał wykorzystywany do produkcji folii, włókien, kulek, gąbek oraz fibryd.

Chitozan jest biozgodnym i biodegradowalnym naturalnym biopolimerem. Jest zdolny do absorpcji płynów i wykazuje właściwości przepuszczalności dla wody. Chitozan jest używany na wiele sposobów w medycynie i farmacji jako nośnik leków i wielu angiogennych czynników wzrostu [17, 18]. W piśmiennictwie opisane są membrany chitozanowe

sieciowane glutaraldehydem oraz złożone membrany zawierające kolagen i chitozan w różnych proporcjach [19, 20], wykorzystywane do kontrolowanego uwalniania leków.

Inny sposób modyfikacji polegał na konstruowaniu membran warstwowych z użyciem innego obojętnego polimeru o większej lepkości – metylocelulozy i alginianu z dodatkiem plastyfikatorów (glicerolu lub glikolu propylenowego). Użycie mieszaniny dwóch polimerów i niewielkich ilości plastyfikatorów, poprawiło znacznie elastyczność otrzymywanych membran [21].

W naszych badaniach użyto membrany chitozanowo-alginianowej. Na ryc. 1 przedstawiono obrazy tej membrany, otrzymane z mikroskopu skaningowego (Quanta 200 SEM). Membrana charakteryzuje się rozwiniętą powierzchnią, chropowatością i porowatością.

Oznaczono szybkość uwalniania czynników wzrostu PDGF-AB i TGF- β z nowo wytworzonej membrany do buforu PBS (0,01 mol/l, pH 7,4) (ryc. 2). Ilość uwolnionego czynnika płytkowego PDGF-AB z badanej membrany, była znacznie wyższa w porównaniu z TGF- β . Największa ilość uwalnianego czynnika była po 3 h inkubacji ($255,41 \pm 8,82$ ng/ml, współczynnik wiązania 3,53). Po 5 h poziom uwalniania był nieco niższy i wynosił $217,24 \pm 13,90$ ng/ml, współczynnik wiązania 4,14 (tab.1).

Stężenie uwolnionego czynnika TGF- β było najwyższe w pierwszej godzinie inkubacji ($114,20 \pm 9,61$ ng/ml, współczynnik 1,12, tak jak to ma miejsce w warunkach *in vivo* [22]. W trzeciej i piątej godzinie inkubacji uwalnianie TGF- β do eluentu wynosiło odpowiednio $11,53 \pm 2,70$ ng/ml, czynnik wiązania 11,06 i $19,40 \pm 2,00$ ng/ml, czynnik wiązania 6,58 (tab. 2).

Z przeprowadzonego doświadczenia wynika, że płytkowy czynnik wzrostu uwalniany jest szybciej z badanej membrany w porównaniu z TGF- β (ryc. 2). Wydaje się, że membrana chitozanowo-alginianowa jest lepszym nośnikiem dla płytkowego czynnika wzrostu (PDGF-AB). Wyniki te sugerują, że zastosowanie w periodontologii płytkowego czynnika wzrostu (PDGF-AB) związanego z chitozanem, może mieć duże znaczenie w procesie regeneracji uszkodzonej tkanki kostnej [23].

Na podstawie uzyskanych wyników badań przedstawionych w tabelach 1 i 2 i na rycinie 2 stwierdzono, że otrzymana membrana wykazuje większą efektywność wiązania czynnika TGF- β i jednocześnie mniejszą efektywność jego uwalniania. Odwrotną sytuację zaobserwowano dla czynnika PDGF-AB. Wiązanie tego czynnika jest słabsze, stąd uwalnianie przebiega efektywniej – blisko 30% po 3 godzinach, po czym maleje do ok. 23%

po 5 godzinach trwania procesu (ryc.2). Stwierdzono, że na ilość związanego czynnika wzrostu przez membranę ma wpływ powierzchnia właściwa membrany i jej powinowactwo do czynnika wzrostu.

WNIOSKI

1. Membrana chitozanowo-alginianowa może być używana w chirurgii stomatologicznej jako nośnik dla angiogennych czynników wzrostu: płytkowego czynnika wzrostu, PDGF-AB i transformującego czynnika wzrostu TGF- β .
2. Stopień uwalniania płytkowego czynnika wzrostu (PDGF-AB) jest znacznie wyższy w porównaniu z uwalnianiem czynnika transformującego TGF- β .
3. Mniejszy stopień uwalniania TGF- β z membrany chitozanowo-alginianowej, wynika z jego większego powinowactwa do złoża polimerowego.
4. Wybór odpowiedniego nośnika, czynnika wzrostu i stopień uwalniania w czasie, może być wykorzystany w chirurgii w zależności od potrzeb.

LITERATURA

- [1] CAPLAN A. I.: Identification of transforming growth factor beta to family members present in bone – inductive protein purified bovine bone. Proc. Natl. Sci. USA (1990), 87, 9843-9847.
- [2] ROBERTS A. B., SPRON M. B.: Physiologic actions and clinical application of transforming growth beta. Growth Factors (1993), 8, 1-9.
- [3] BIELECKI T., GAŹDZIK T. S., CIEŚLIK-BIELECKA A., CIEŚLIK T.: Zastosowanie żelu bogatopłytkowego jako biomateriału stymulującego procesy regeneracji i reparacji tkanek (Application platelet rich gel as biomaterial stimulating regeneration and reparation tissue processes). Inżynieria Biomateriałów (2004), 34, 22-25.
- [4] WEIBRIC G., BUCH R. S., KLEIS W. K., HAFNER G., HITZLER W. E., WAGNER W.: Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. Growth Factors (2002), 20, 2, 93-97.
- [5] KOZAKIEWICZ M., BODEK K. H.: Ocena wpływu nowej błony zaporowej dla sterowanej regeneracji tkanek na aktywność płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym

- (Evaluation of novel GBR barrier membrane influence on platelet rich plasma trombocyte accitivity). *Prot. Stom.* (2005), 55, 4, 279 – 283.
- [6] PARK M. S., KIM S. S., CHO S. W., CHOI C. Y., KIM B. S.: Enhancement of the osteogenic efficacy of osteoblast transplantation by the sustained delivery of basic fibroblast growth factor. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* (2006), 79, 2, 353-359.
- [7] BERGER J. REIST M., MAYER M. J. et al.: Structure and interactions in covalent and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2004), 57, 19-34.
- [8] KIM S. E., PARK J. H., CHAO Y. W., CHUNG H., JEONG S. Y., LEE E. B., KWON I.C.: Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- β 1: Implications for cartilage tissue engineering. *J. Control. Release*, (2003), 91 (3), 365-374.
- [9] ZARZYCKI R., MODRZEJEWSKA Z.: Zastosowanie chitozanu w medycynie i inżynierii biomedycznej (Chitosan applicaction in medicine and biomedical engineering). *Polimery w Medycynie*, (2003), 1-2, 47-58.
- [10] TAN W., KRISHNARAJ R., DESAI A.: Evaluation of nanoconstructed composite collagen – chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng.* (2001), 7, 2, 203-210.
- [11] SARASWATHY G., PAL S., ROSE C. et al.: A novel bio-inorganic bone implant containing deglued bone, chitosan and gelatin. *Bull. Matr. Sci.* (2001), 24, 4, 415-420.
- [12] CURIE L. J., SHARPE J. R., MARTIN R.: The use of fibrin glue grafts and tissue engineered skin replacements: a review. *Plast. Reconstr. Surg.* (2001), 108, 6, 1713-1726.
- [13] CHOU C. H., CHENG W. T., KUO T. F., SUN J. S., LIN F. H., TSAI J. C.: Fibrin glue mixed with gelatin/hyaluronic acid/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer for articular cartilage tissue engineering: the results of real-time polymerase chan reaction. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* (2007), 83 (3), 575-67.
- [14] JEON O., KANG S. W., LIM H.W., HYUNG CHUNG J., KIM B. S.: Long- term and zero-order release of basic fibroblast growth factor from heparin- conjugated poly(L-lactide-coglycolide) nanosphere and fibrin gel. *Biomaterials* (2006), 27, 8, 1598-1607.

- [15] GÓRECKI M.: Fizykochemiczne problemy układów substancja lecznicza – polimer. (Physiochemical problems healing substance – polymer complex). *Farm. Pol.* (1994), 50, 1071-1078.
- [16] ŁUKASZCZYK J., SCHACHT E.: Some novel applications of synthetic polymers in drug delivery. *Polymers in Medicine* (1992), 22, 3-29.
- [17] CANDY T., SHARMA C. P.: Chitosan – as a biomaterial. *Art. Cells Art. Organs*, (1999), 18, 1-24.
- [18] LEE Y. P., PARK Y. J., LEE S. J., KU Y., HAN S. B., KLOKKEVOLD P.R., CHUNG C. P.: The bone regenerative effect of platelet derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J. Periodontol.*, (2000), 71, 418-424.
- [19] THACHARODI D., RAO K. P.: Propranolol hydrochloride release behavior of crosslinked chitosan membranes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, (1993), 58, 177-181.
- [20] THACHARODI D., RAO K. P.: Collagen-chitosan composite membranes for controlled release of propranolol hydrochloride. *Int. J. Pharm.*, (1995), 120, 115-118.
- [21] KOZAKIEWICZ M., BODEK K. H.: Fizykochemiczne właściwości membran do sterowanej regeneracji tkanek opartych na bazie chitozanu (Physiochemical features of a membrane based on chitosan designed for guided tissue regeneration). *Czas. Stom.* (2003), 56, 5, 332-337.
- [22] KOZAKIEWICZ M.: Ocena wyników leczenia ubytków kości z zastosowaniem materiałów kośćcizastępczych w chirurgii stomatologicznej (Healing results assessment of bone lesion in dental surgery). *Rozprawa habilitacyjna, Uniwersytet Medyczny w Łodzi*, 2004.
- [23] PARK Y. J., LEE Y. M., PARK S. N., SHEEN S. Y., CHUNG C. P., LEE S. J.: Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, (2000), 21, 2, 153-159.

Praca sfinansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, temat nr 502-13-781 i 502-12-604.

Adres autorów

Zakład Farmacji Aptecznej

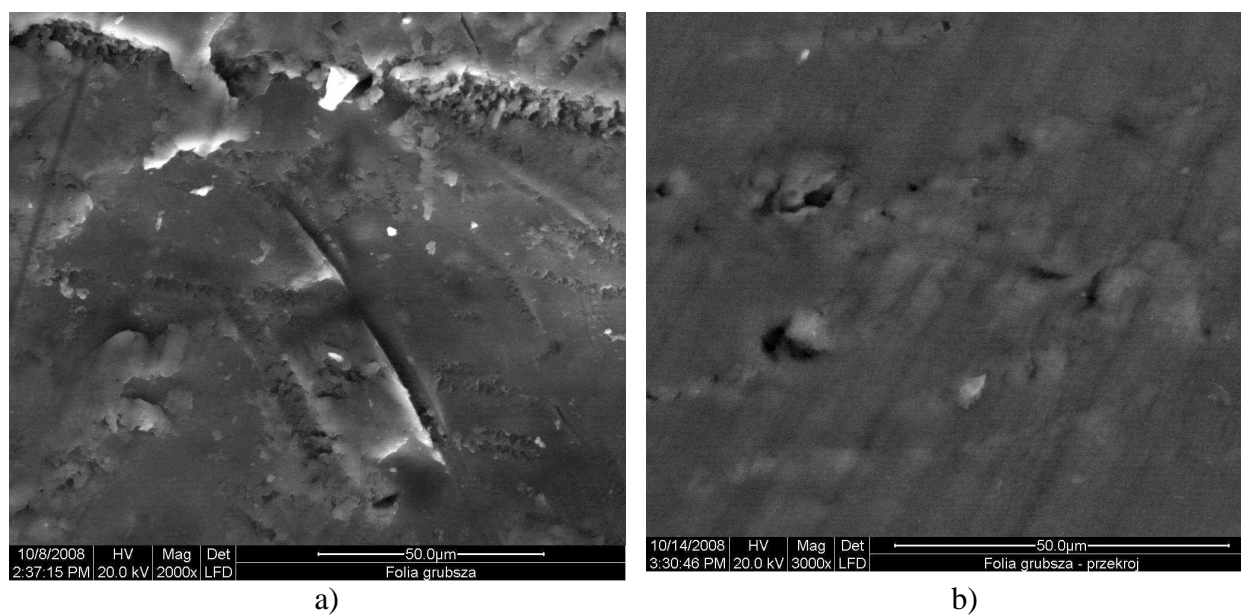
Katedra Farmacji Stosowanej

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

tel/fax 042 677 92 40

hbodek@pharm.am.lodz.pl



RYC. 1. Mikroskopowy obraz membrany chitozanowo-alginianowej; a) widok powierzchni, b) przekrój poprzeczny

FIG. 1. Microscopic view chitozan-alginate membrane; a) microscopic view; b) cross-section

TABELA 1. Stężenie uwolnionego PDGF-AB [ng/ml] do buforu w czasie procesu elucji do fosforanowego buforu PBS 0,1 [mol/l] pH 7,4 i współczynnik wiązania (WW) PDGF-AB z nośnikiem chitozanowo-alginiowym.

TABLE 1. Concentration of release PDGF-AB [ng/ml] into PBS phosphate buffer 0.01 [mol/l] pH 7.4 and PDGF-AB binding factor (WW) with chitosan–alginate carrier

| Czas Time [h] | 0,5 | 1 | 3 | 5 |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|
| \bar{X} [ng/ml] | 112.75 | 100.22 | 255.41 | 217.24 |
| \pm SD n = 8 | 4.77 | 5.35 | 8.88 | 13.90 |
| WW | 7.99 | 8.90 | 3.53 | 4.14 |

WW = całkowite stężenie/stężenie uwolnionego PDGF-AB [ng/ml]

WW = total concentration /concentration of release PDGF-AB [ng/ml]

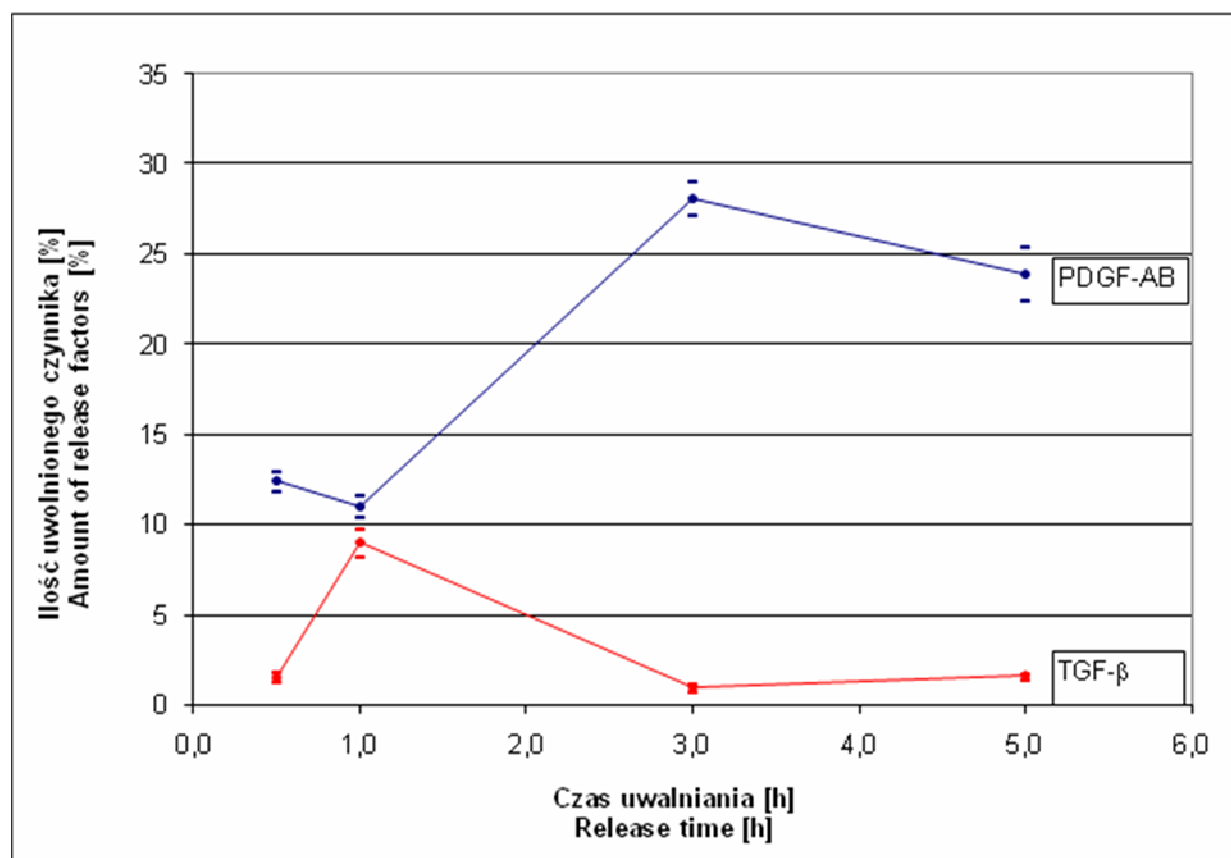
TABELA 2. Stężenie uwolnionego TGF- β [ng/ml] do buforu w czasie procesu elucji do fosforanowego buforu PBS 0,1 [mol/l] pH 7,4 i współczynnik wiązania (WW) TGF- β z nośnikiem chitozanowo-alginiowym.

TABLE 2. Concentration of release TGF- β [ng/ml] into PBS phosphate buffer 0.01 [mol/l] pH 7.4 and TGF- β binding factor (WW) with chitosan–alginate carrier

| Czas Time [h] | 0,5 | 1 | 3 | 5 |
|-------------------|-------|--------|-------|-------|
| \bar{X} [ng/ml] | 18.82 | 114.20 | 11.53 | 19.40 |
| \pm SD n = 8 | 3.29 | 9.62 | 2.70 | 2.01 |
| WW | 6.78 | 1.12 | 11.06 | 6.58 |

WW = stężenie całkowite/stężenie uwolnionego TGF- β [ng/ml]

WW = total concentration /concentration of release TGF- β [ng/ml]



RYC.2 . Profile uwalniania czynników wzrostu z membrany chitozanowo-alginianowej

FIG. 2. Release profile growth factors from chitosan-alginate membrane