

DRAGANA D. MITROVIĆ<sup>1</sup>  
JASMINA J. STOJKOVSKA<sup>2</sup>  
BOJANA M. OBRADOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Galenika a.d., Beograd, Srbija  
<sup>2</sup>Tehnološko-metalurški fakultet,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd,  
Srbija

NAUČNI RAD

UDK 544.773.432:66.09

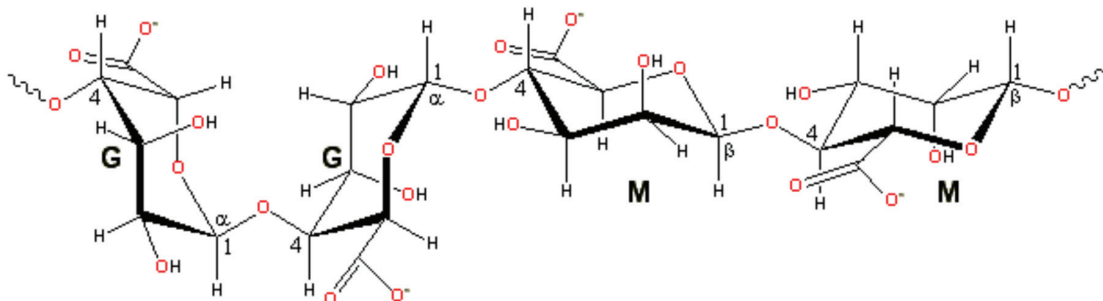
DOI: 10.2298/HEMIND100302038M

## ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI KONTROLISANOG BUBRENJA I RAZGRADNJE ALGINATNIH MIKROČESTICA U RAZBLAŽENIM RASTVORIMA NATRIJUM-CITRATA

U ovom radu je ispitivana mogućnost kontrolisane degradacije mikročestica kalcijum-alginata (1,5 mas.%, 800  $\mu\text{m}$  prečnik) u medijumu za kulture ćelija uz male koncentracije natrijum-citrata (0,05–0,5 mM). Određeni su kinetika i stepen bubrenja čestica, i njihove mehaničke karakteristike u bioreaktoru sa mehaničkom stimulacijom. Rezultati su ukazali na mehanizam razgradnje po kome  $\text{Na}^+$  prvo zamenjuju  $\text{Ca}^{2+}$  vezane za manuronske ostatke, dovodeći do bubrenja čestica, a zatim u drugoj fazi zamenjuju i  $\text{Ca}^{2+}$  čvršće vezane za guluronske ostatke što dovodi do pucanja čestica. Proces bubrenja je bio limitiran brzinom ispravljanja polimernih lanaca, a specifična brzina je pri povećanju koncentracije citrata težila maksimalnoj vrednosti od  $\sim 0,34 \text{ d}^{-1}$ . Dobijeni rezultati su značajni za potencijalnu primenu alginatnih hidrogelova za kontrolisano otpuštanje terapeutika kao i u inženjerstvu tkiva.

Alginat je prirodni polisaharid i predstavlja jedan od najšire ispitivanih i koršćenih biomaterijala u različitim oblastima biotehnologije, farmacije i medicine. U hemijskom pogledu, alginati su sačinjeni od nerazgranatih binarnih kopolimera  $\beta$ -D-manuronske (M) i  $\alpha$ -L-guluronske (G) kiseline, koji su međusobno povezani 1,4-glikozidnim vezama (slika 1). G i M jedinice su povezane u blokove koji se mogu naći u tri osnovna tipa: homopolimerni G blokovi (GG), homopolimerni M blokovi (MM) i heteropolimerni naizmenično raspoređeni blokovi (MG).

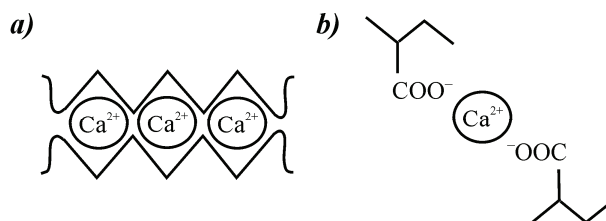
kome se  $\text{Ca}^{2+}$  u alginatu vezuju najpre samo za guluronske ostatke, sve dok ne dođe do zasićenja, odnosno dok se sva mesta na GG blokovima ne popune. Pri tome se dva ili više polimernih lanaca međusobno vezuju stvarajući šupljine poput onih u kutiji za jaja u koje se smeštaju joni kalcijuma (slika 2a). Sa daljim dodavanjem  $\text{Ca}^{2+}$ , počinju da ih vezuju i manuronski ostaci jonskim interakcijama sa karboksilnim grupama,  $\text{COO}^-$  (slika 2b). Ove veze su slabije od veza sa GG blokovima i lakše se raskidaju jonskom izmenom.



Slika 1. Struktura jednog lanca alginata (G – ostatak guluronske kiseline; M – ostatak manuronske kiseline).  
Figure 1. Structure of an alginate polymer chain (G – guluronic acid residue; M – manuronic acid residue).

Alginati pokazuju vrlo veliki afinitet prema dvovalentnim katjonima, koji opada po sledećem redosledu:  $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} = \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$ . Ovi katjoni vezuju kako različite molekule polimera tako i različite delove istog polimernog lanca čime dolazi do formiranja razgranatih struktura nerastvornih u vodi i stvaranja hidrogela. Kalcijum-alginat je jedan od najčešće korišćenih alginatnih hidrogelova.

Za opisivanje mehanizma formiranja gela, koristi se „egg-box“ model (model kutije za jaja) [1], prema



Slika 2. Vezivanje  $\text{Ca}^{2+}$  za alginatne lance: a) „egg-box“ model (model kutije za jaja) vezivanja jona kalcijuma u šupljine između GG segmenata; b) jonske interakcije sa karboksilnim grupama u MM blokovima (prema [13]).  
Figure 2. Bonding interactions between  $\text{Ca}^{2+}$  and alginate chains: a) egg-box model of calcium ion bonding to GG segments; b) ionic interactions with carboxyl groups in MM segments (according to [13]).

Autor za prepisku: B. Obradović, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija.  
E-pošta: bojana@tmf.bg.ac.rs  
Rad primljen: 2. mart 2010.  
Rad prihvaćen: 14. jun 2010.

Zbog svoje dostupnosti, biokompatibilnosti, biodegradabilnosti i hidrofilnosti alginatni hidrogelovi se uspešno koriste za imobilizaciju širokog spektra kako enzima, terapeutika i drugih hemijskih i biohemijskih agenasa, tako i različitih ćelija, kao što su mikroorganizmi i ćelije biljnog, životinjskog i humanog porekla [2,3]. U medicini je posebno atraktivna primena alginata za kontrolisano otpuštanje biološki aktivnih molekula kao i u inženjerstvu tkiva gde služi kao nosač ćelija [3,4]. Pri tome, posebnu pogodnost predstavlja lako oblikovanje alginatnih hidrogelova uključujući mogućnost kontrolisane proizvodnje sferičnih čestica i mikročestica [5–7] i imobilizacije ćelija hrskavice i kostne srži [8,9]. Ovaj oblik nosača ima veliku površinu pogodnu za vezivanje/otpuštanje biološki aktivnih molekula, mala difuziona rastojanja unutar matrice gela, mogućnost jednostavne primene putem injektiranja bez potrebe za hirurškim zahvatima kao i mogućnost podsticanja vaskularizacije i protoka fluida unutar pakovanog sloja čestica [10].

Međutim, za primenu u medicini i, naročito, u inženjerstvu tkiva, veoma je bitno obezbediti striktnu kontrolu svojstava biomaterijala, a posebno brzine degradacije i biomehaničkih karakteristika [3]. Jonski umreženi alginati rastvaraju se na neutralnoj pH vrednosti u prisustvu npr. citrata, fosfata i laktata kao i u prisustvu  $\text{Na}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , gubeći dvovalentne vezujuće katjone, što dovodi do nekontrolisane i spore degradacije *in vivo* [11–14]. Pri tome, generalno, ovi hidrogelovi najpre bubre, a zatim dolazi i do razaranja strukture ali ovaj proces nije sasvim ispitan.

Istraživanja bubrenja kalcijum-alginatnih hidrogelova su pokazala da kinetika i stepen bubrenja zavise od koncentracije i sastava alginata [15] i posebno od udela G blokova [14,16,17], koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u rastvoru korišćenom za geliranje [16,18,19], koncentracije antigeli- rajućih agenasa [15,20,21] i pH vrednosti rastvora u kome se odvija bubrenje [22–24]. Generalno, veće koncentracije alginata sa većim udelom G blokova i uz veće koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  pri geliranju, dovode do formiranja čvršćih struktura manje podložnih bubrenju. Osušeni hidrogelovi bubre u vodenim rastvorima usled hidratacije polimernih lanaca pri čemu se stepen bubrenja povećava sa povećanjem pH vrednosti. Prisustvo jona natrijuma dovodi do povećanja stepena bubrenja i apsorpcije vode usled izmene jona kalcijuma prvenstveno vezanih za manuronske ostatke pri čemu dolazi do povećavanja elektrostatičkog odbijanja karboksilnih grupa i relaksacije polimernih lanaca [17,20,21]. Uz to, prisustvo citrata, fosfata i laktata pospešuje jonsku izmenu i rastvaranje kalcijum-alginatnih hidrogelova usled većeg afiniteta prema jonima kalcijuma i stvaranja nearstvnih kalcijumovih soli [20,22,24,25].

Količina apsorbovane vode pri bubrenju,  $\Delta m$ , u opštem slučaju proporcionalna je vremenu,  $t$ , u obliku zavisnosti [20]:

$$\frac{\Delta m}{\Delta m_r} = Kt^n \quad (1)$$

gde je  $\Delta m_r$  količina apsorbovane vode pri dostizanju ravnoteže,  $K$  konstanta, a  $n$  eksponent koji se kreće u opsegu 0,5–1. Kada je proces bubrenja kontrolisan brzinom difuzije, prema Fikovom zakonu eksponent u jednačini (1) iznosi  $n = 0,5$ . S druge strane, ukoliko je proces bubrenja limitiran brzinom relaksacije polimernih lanaca, eksponent iznosi  $n = 1$ . Kada su brzine ova dva procesa približne, vrednost eksponenta se kreće između 0,5 i 1. Ispitivanja kinetike bubrenja kalcijum-alginatnih hidrogelova koncentracije 2,5–4 mas.% u obliku čestica u fosfatnom puferu su pokazala da je ovaj proces bio kontrolisan brzinom relaksacije polimernih lanaca [20,22,24].

Pri izlaganju kalcijum-alginatnih hidrogelova višim koncentracijama antigeli- rajućih agenasa ili u dužem vremenskom periodu, nakon bubrenja dolazi do razaranja strukture gela i rastvaranja usled izmene i jona kalcijuma vezanih za guronske ostatke [17,20,24,25].

Mehanička čvrstoća alginatnih hidrogelova kao i većine hidrogelova, generalno je mala uz viskoelastično reološko ponašanje [17,26–28]. Pri tome zavisi od sastava i strukture kalcijum-alginata tako da se smanjuje prilikom bubrenja i izmene jona kalcijuma jonima natrijuma [17,29]. Uz to, pakovani sloj čestica može da ispolji drugačije biomehaničke karakteristike usled zadržavanja vode u međučestičnim kanalima nego uniformni uzorci hidrogela u obliku ploča ili membrana [30]. Za primenu u inženjerstvu tkiva posebno je značajno poznavanje performanse biomaterijala u režimu dinamičkog opterećenja relevantnog za fiziološke uslove kao što je to dinamička kompresija u slučaju tkiva hrskavice i kosti u artikularnim zglobovima. Bioreaktori koji podražavaju uslove u prirodnoj *in vivo* sredini razvijeni za primenu u inženjerstvu funkcionalnih tkiva, mogu isto tako da služe za evaluaciju novih biomaterijala u *in vitro* uslovima i predviđanje njihovog ponašanja nakon implantacije, što može da doprinese smanjenju obima ispitivanja na životinjama.

Cilj ovog rada je bio da se ispita mogućnost kontrolisanog bubrenja i degradacije alginatnih mikročestica u medijumu za kulture ćelija sisara uz dodavanje natrijum-citrata u malim koncentracijama. Iako se natrijum-citrat pri koncentraciji od 50 mM uobičajeno koristi za gotovo trenutno rastvaranje hidrogelova kalcijum-alginata pri analizi imobilisanih ćelija [31], mogućnost kontrolisanog bubrenja i degradacije ovih hidrogelova pri nižim koncentracijama Na-citrata nije do sada ispitivana. U radu su praćene promene mase i izgleda mikročestica, a takođe određene su i mehaničke karakteristike pakovanog sloja mikročestica pri dinamičkoj kompresiji u biorektoru sa mehaničkom stimulacijom pod uslovima koji odgovaraju fiziološkim u tkivu hrskavice.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### Materijali

U ovom radu je korišćen natrijum-alginat (low viscosity Protanal LF 20/40, FMC BioPolymer, SAD) koji je sadržao visok procenat ostataka guluronske kiseline (67%) dok je procenat manuronskih ostataka iznosio 33% [32]. Pri tome su GG blokovi činili molski udeo od 55% dok su udeli MM, MG i GM blokova iznosili 21, 12 i 12%, redom, što ukazuje na dobre mogućnosti geliranja ovog alginata [32]. Kao kultivacioni medijum korišćen je DMEM (Dulbecco modifikovan Eagle medijum, Sigma, SAD) dok je za rastvaranje Na-alginata korišćen fiziološki rastvor (Zdravlje Leskovac, 0,9% NaCl). Ostale hemikalije su bile p.a. čistoće i korišćene su bez daljeg prečišćavanja.

### Dobijanje alginatnih mikročestica

Alginatne mikročestice su dobijene primenom elektrostatičke ekstruzije kako je to ranije opisano [31,33]. Prah Na-alginata je rastvoren u fiziološkom rastvoru do koncentracije 1,5 mas.% i sterilisan ključanjem u toku 30 min. uz mešanje pomoću magnetne mešalice. Ohlađen rastvor je prebačen u plastični špric (10 ml) i istiskivan pomoću infuzione pumpe (Racel, Scientific Instruments, Stamford, CT, SAD) kroz iglu sa ravnim vrhom (23G, Small Parts, Inc., SAD) protokom od 39,3 ml/h. Igla je bila pozitivno naelektrisana pomoću elektrode izvedene iz generatora visokog napona (Model 30R, Bertan Associates, Inc., New York, SAD), dok je elektroda sa uzemljenjem uronjena u rastvor 1,5 mas.% CaCl<sub>2</sub>, koji je prethodno sterilisan autoklaviranjem. Na taj način je između vrha igle i gornjeg nivoa rastvora CaCl<sub>2</sub> ostvareno određeno električno polje, tako da se potiskivani rastvor otkidao od vrha igle u obliku mlaza sitnih naelektrisanih kapljica pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile. Rastojanje između vrha igle i rastvora CaCl<sub>2</sub> je u nekoliko eksperimentalnih serija varirano između 2,1 i 2,6 cm, a elektrostatički napon u rasponu od 4,4 do 5,1 kV, kako bi se zadržala uniformna veličina kapljica. Kapi su sakupljane u rastvoru CaCl<sub>2</sub> uz konstantno mešanje pri čemu je dolazilo do razmene Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> i očvršćavanja kapi u obliku sfernih mikročestica. Mikročestice su zatim ostavljene da geliraju u rastvoru uz mešanje još 20 do 30 min, nakon čega su prenete u sterilan kultivacioni medijum DMEM na +4 °C do dalje upotrebe. Pri tome je kontrolna grupa

mikročestica testirana u biorektoru sa mehaničkom stimulacijom odmah posle geliranja.

### Ispitivanje degradacije alginatnih mikročestica

Degradacija alginatnih mikročestica je ispitivana u rastvoru medijuma DMEM kome je dodat Na-citrat u opsegu koncentracija od 0,05 do 0,5 mM (tabela 1). Čestice su bile smeštene u sterilnu posudu sa 6 otvora (0,5 g čestica i 3 ml medijuma u otvoru-bunarčiću) i ostavljene da se mešaju na orbitalnoj tresilici pri brzini od 100 obrt/min. Uzorkovanje je vršeno u periodu od 10 dana i to na svaka 24 sata. Čestice su filtrirane kroz filter prečnika 150 μm (Partec selltrics, SAD) povezan sa vakuum pumpom i zatim merene na analitičkoj vagi. Ispitivanja su izvedena u triplikatu, a posle merenja čestice su vraćane u 3 ml svežeg medijuma. Radi ispitivanja brzine bubrenja na isti način su izvedeni dodatni eksperimenti u triplikatu u toku 5 dana pri čemu je koncentracija Na-citrata iznosila 0,35 mM u rastvoru medijuma DMEM, a svi ostali eksperimentalni uslovi su bili isti kao u prethodne 3 eksperimentalne serije.

Stepen bubrenja, *SB*, je računat kao porast mase čestica u odnosu na početnu masu čestica, *m*<sub>0</sub>:

$$SB = \frac{\Delta m}{m_0} = \frac{m - m_0}{m_0} \quad (2)$$

gde je *m* masa čestica izmerena u određenom vremenskom trenutku. Veličina čestica je određena slikanjem najmanje 10 čestica pod optičkim mikroskopom.

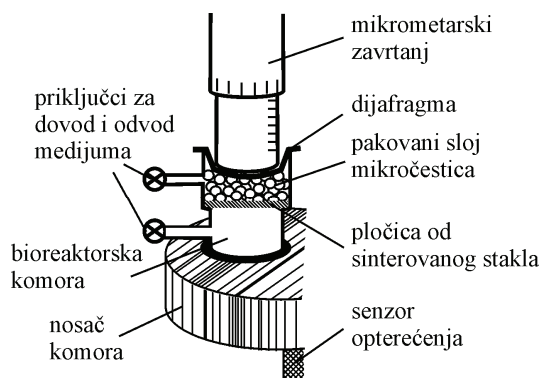
### Ispitivanje mehaničkih karakteristika alginatnih mikročestica u biorektorskom sistemu sa mehaničkom stimulacijom

Za ispitivanje mehaničkih karakteristika alginatnih mikročestica u ovom radu korišćen je bioreaktor sa mehaničkom stimulacijom koji imitira uslove u tkivu hrskavice, kako je to prethodno opisano [34]. Ukratko, bioreaktor se sastoji od 6 komora za uzorke biomaterijala ili tkiva, koje se postavljaju na nosač, a koji se zatim pričvršćuje za metalnu osnovu. Ispod nosača se nalazi senzor opterećenja Scaime AL3C3SH5e (Scaime, Francuska) kojim je omogućeno merenje srednjih opterećenja svih komora u nosaču. Ispod metalne osnove je montiran step-motor (Surestep STP-MTR-23055, AutomationDirect, GA, SAD) kojim se osnova zajedno sa nosačem i komorama pomera u vertikalnom pravcu. Komore za uzorke su polipropilenski cilindri u koje se

Tabela 1. Eksperimentalni uslovi pri ispitivanju degradacije alginatnih mikročestica (početna masa čestica 0,500 g)  
Table 1. Experimental conditions in degradation studies of alginate microbeads (initial bead mass was 0.500 g)

Eksperimentalna serija	Koncentracija Na-citrata u rastvoru (mM)	Koncentracija Na-citrata po jedinici mase čestica (μmol/g alginata)
1	0,5	3
2	0,2	1,2
3	0,05	0,30

stavlja pločica od sinterovanog stakla na koju se onda smešta uzorak tkiva/biomaterijala dimenzija do 16 mm prečnika i debljine do 3 mm (slika 3). Na komorama se nalaze dva priključka za dovod odnosno odvod medijuma čime je moguće ostvariti protok medijuma direktno kroz ispitivani uzorak. Komore su pokrivene dijafragmom (Bergaflex, Termoplast d.o.o., Beograd, Srbija) na koje naležu mikrometerski zavrtnji (prečnika 11 mm). Na taj način je moguće precizno postaviti dijafragmu u odnosu na uzorak u svakoj komori ponaosob nezavisno od debljine uzorka. Rad bioreaktorskog sistema odnosno brzina, amplituda i frekvencija pomeranja metalne osnove, dužine perioda rada i pauze, broj ciklusa rada reaktora kao i akvizicija signala sa senzora opterećenja, je kontrolisan pomoću više različitih aplikacija razvijenih u programskom paketu Labview (National instruments, TX, SAD) [34].



Slika 3. Šematski prikaz bioreaktorske komore na nosaču: komora sa pakovanim slojem alginatnih mikročestica se smešta u nosač i zatvara dijafragmom na koju naleže mikrometerski zavrtnj; ispod nosača se nalazi senzor opterećenja. Figure 3. Bioreactor cartridge: the cartridge with a packed bed of alginate microbeads is placed on the holder and closed by a diaphragm on top of which a micrometer screw is positioned; underneath the cartridge holder a load sensor is mounted.

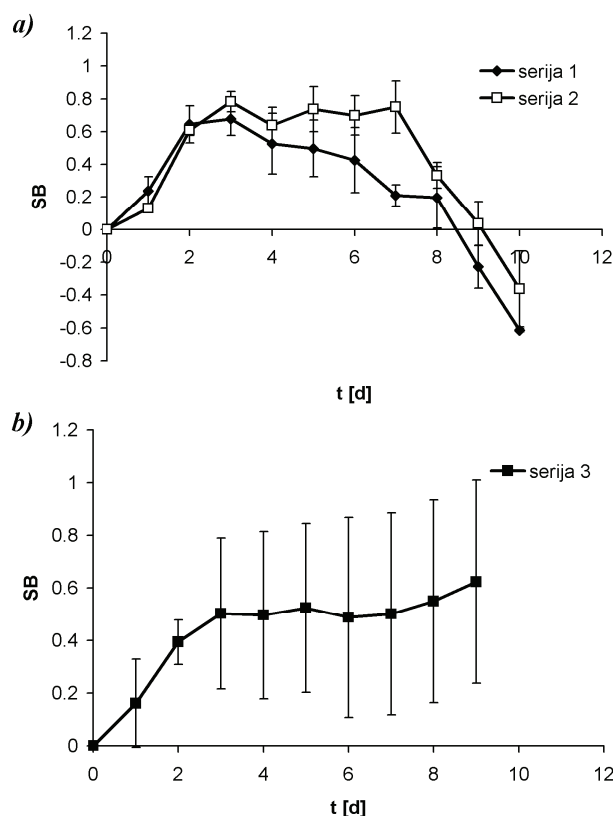
Bioreaktor je korišćen za određivanje mehaničkih karakteristika pakovanog sloja kontrolnih alginatnih mikročestica i mikročestica eksperimentalne serije 2 (tabela 1) koje su stajale 3 i 7 dana u medijumu DMEM sa 0,2 mM Na-citrata. Pri tome su testirane po tri bioreaktorske komore istovremeno napunjene destilovanom vodom i u koje je dodato po oko 0,6 g određene vrste mikročestica (3 mm početna visina pakovanog sloja). Pre svakog merenja mikrometerski zavrtnji su bili pozicionirani tako da dijafragma dodiruje gornju površinu uzorka, što je određeno vizuelno, kao i povećanjem odziva senzora na opterećenje. Uzorci su testirani pri deformaciji od 10% (apsolutni pomeraj 300  $\mu\text{m}$ ) i pri brzini deformacije od 337,5  $\mu\text{m/s}$ . Merenja su ponovljena najmanje tri puta ( $N = 3$ ). Od izmerenih vrednosti odziva senzora na dato opterećenje oduzete su vrednosti odziva dijafragme pri deformaciji, a zatim su izračunate

vrednosti sile pomoću kalibracione krive kako je to prethodno opisano [21]. Vrednosti napona su zatim izračunate normalizovanjem vrednosti sile po površini poprečnog preseka mikrometerskog zavrtnja. Moduli elastičnosti su određeni iz nagiba krive napon–deformacija.

## REZULTATI

Oko 80 ml sterilnih alginatnih mikročestica sferičnog oblika i veličine  $800 \pm 80 \mu\text{m}$  je korišćeno u ispitivanjima kontrolisane degradacije dok je oko 15 ml mikročestica prečnika  $822 \pm 11 \mu\text{m}$  predstavljalo kontrolnu grupu u ispitivanjima mehaničkih karaktersitika. Gustina čestica je iznosila  $1102 \text{ g/dm}^3$ .

Mogućnost kontrolisane degradacije alginatnih mikročestica pri niskim koncentracijama Na-citrata u medijumu za kultivaciju ćelija sisara je ispitivana za tri koncentracije (tabela 1). Step ena bubrenja čestica u odnosu na početnu masu čestica (0,5 g) u toku 10 dana za sve tri eksperimentalne serije je prikazan na slici 4.



Slika 4. Zavisnost stepena bubrenja (SB) alginatnih mikročestica od vremena pri različitim koncentracijama Na-citrata: a) eksperimentalne serije 1 (0,5 mM) i 2 (0,2 mM); b) eksperimentalna serija 3 (0,05 mM). Figure 4. Swelling degree of alginate microbeads as a function of time in Na-citrate solutions of different concentrations: a) experimental series 1 (0.5 mM) and 2 (0.2 mM); b) experimental series 3 (0.05 mM)

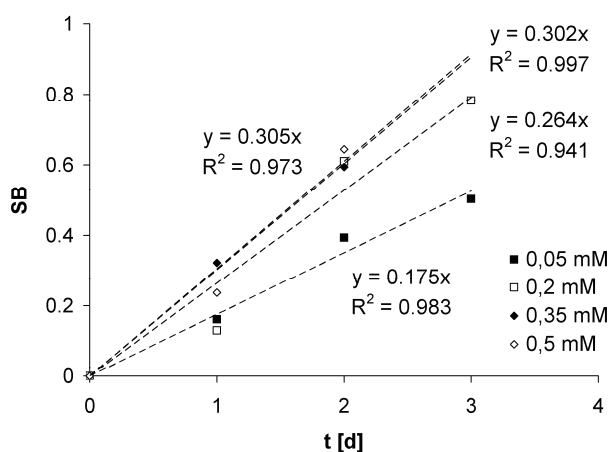
Sa slike 4 se može uočiti da se proces razgradnje alginatnih mikročestica može podeliti u tri faze: *i*) faza bubrenja, *ii*) period ravnoteže i *iii*) faza degradacije. Faza bubrenja je iznosila oko 2 dana za eksperimentalnu seriju 1 odnosno najvišu koncentraciju Na-citrata (0,5 mM) i oko 3 dana za ostale dve eksperimentalne serije. Isto tako, period stabilnosti u ravnoteži je za najvišu koncentraciju Na-citrata (0,5 mM, serija 1) iznosio oko 1 dan, za srednju (0,2 mM, serija 2) oko 4 dana, a pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji (0,05 mM, serija 3) posle 10 dana ispitivanja nije došlo do razgradnje čestica odnosno faza ravnoteže je bila duža od 7 dana (merenje desetog dana nije bilo uspešno pa nije prikazano na slici 4b). Pri tome je standardna devijacija merenja u ovoj eksperimentalnoj seriji bila najveća i iznosila je od 20–25% (slika 4b).

Ravnotežni stepen bubrenja nije bio statistički značajno različit u tri ispitivane eksperimentalne serije i iznosio je redom  $166 \pm 11$ ,  $172 \pm 12$  i  $153 \pm 35\%$  u odnosu na početnu masu čestica.

Brzina bubrenja je ispitana primenom jednačine (1) na eksperimentalne rezultate pri čemu se pokazalo da u datom opsegu vrednosti eksponenta od 0,5 do 1, najmanja kvadratna odstupanja daje model sa eksponentom  $n = 1$ . U skladu sa ovim rezultatom, zavisnost stepena bubrenja od vremena odnosno porast mase čestica usled jonske izmene i raskidanja veza između polimernih lanaca, je dalje modelovan kinetikom nultog reda primenom jednačine:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = SB = kt \quad (3)$$

gde je  $k$  konstanta brzine bubrenja ili specifična brzina bubrenja u odnosu na početnu masu čestica. Jednačina



Slika 5. Zavisnost stepena bubrenja (SB) alginatnih mikročestica od vremena pri različitim koncentracijama Na-citrata: eksperimentalni podaci (simboli) i linearne zavisnosti sa najmanjim kvadratnim odstupanjima (isprekidane linije).  
Figure 5. Swelling degree of alginate microbeads as a function of time at different concentrations of Na-citrate: experimental data (symbols) and linear regression fits (dashed lines).

(3) je primenjena na eksperimentalne podatke u toku prva 3 odnosno 4 dana eksperimenta za četiri ispitivane koncentracije Na-citrata i metodom najmanjih kvadratnih odstupanja određene su specifične brzine bubrenja (slika 5).

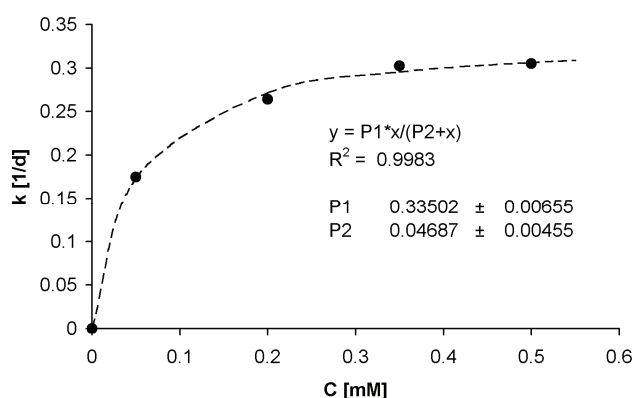
Uočeno je da su specifične brzine bubrenja rasle sa porastom koncentracije jona citrata u rastvoru težeći određenoj asimptotskoj vrednosti (slika 6). Na ovakav oblik zavisnosti može se primeniti model hiperboličke funkcije:

$$k = \frac{P_1 C}{P_2 + C} \quad (4)$$

gde je  $C$  koncentracija Na-citrata u rastvoru, a  $P_1$  i  $P_2$  parametri modela pri čemu  $P_1$  predstavlja maksimalnu vrednost specifične brzine bubrenja dok  $P_2$  predstavlja koncentraciju Na-citrata pri kojoj je specifična brzina bubrenja jednaka polovini maksimalne. Primenom jednačine (4) na eksperimentalne podatke, metodom najmanjih kvadratnih odstupanja određena je maksimalna vrednost specifične brzine bubrenja od  $0,335 \text{ d}^{-1}$  dok parametar  $P_2$  iznosi  $0,047 \text{ mM}$  (slika 6).

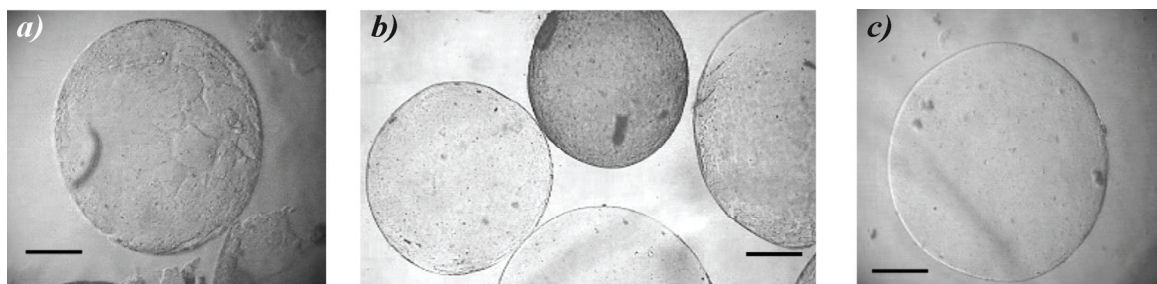
Posle određenog vremenskog perioda bubrenja i stabilnosti nabubrelih čestica, u rastvorima većih koncentracija Na-citrata dolazi do degradacije mikročestica što se uočava gubitkom mase (slika 4a). Međutim, u ovom radu kinetika degradacije alginatnih mikročestica nije mogla biti definisana pošto tačan gubitak mase čestica nije bilo moguće precizno odrediti jer se jedan deo ostataka čestica gubio prilikom filtriranja i izdvajanja čestica iz rastvora.

Na slici 7 prikazane su fotografije alginatnih mikročestica iz tri ispitivane eksperimentalne serije posle 10 dana stajanja u rastvorima Na-citrata. Mikročestice iz



Slika 6. Zavisnost specifične brzine bubrenja alginatnih mikročestica,  $k$ , od koncentracije Na-citrata u rastvoru,  $C$ : eksperimentalno određeni podaci (simboli) i predviđanja modela (jednačina (4)) sa najmanjim kvadratnim odstupanjima (isprekidana linija).

Figure 6. Specific swelling rate of alginate microbeads,  $k$ , as a function of Na-citrate concentration,  $C$ : experimental data: symbols, model predictions (Eq. (4)): dashed line.



Slika 7. Alginatne mikročestice posle 10 dana stajanja u rastvorima Na-citrata: a) eksperimentalna serija 1 (0,5 mM): površina čestice je ispucala i vidljivi su ostaci razgrađenih čestica; b) eksperimentalna serija 2 (0,2 mM): uočljive su čestice sa naboranom i ispucalom površinom kao i čestice koje izgledaju glatke i netaknute; c) eksperimentalna serija 3 (0,05 mM): površina čestice je glatka i ne uočavaju se znaci rastvaranja; (razmera: 200  $\mu\text{m}$ ).

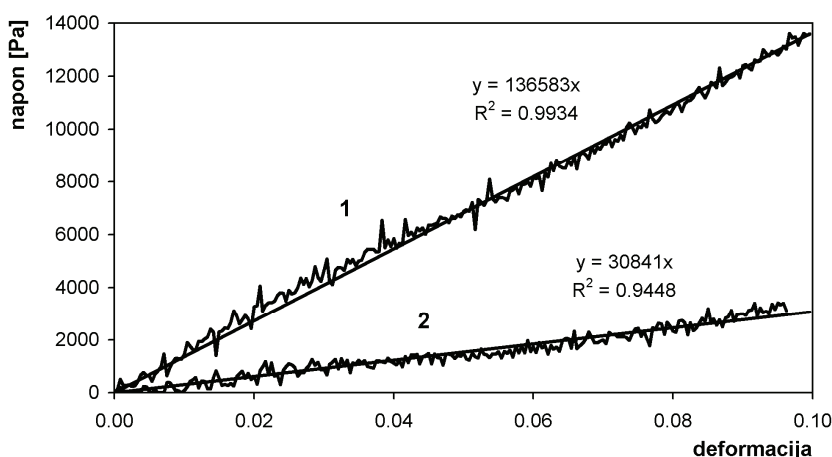
Figure 7. Alginate microbeads after 10 days in Na-citrate solutions: a) experimental series 1 (0.5 mM): the bead surface is fractured and parts of degraded beads are visible; b) experimental series 2 (0.2 mM): beads with wrinkled and fractured surface can be noted as well as the beads that appear smooth and intact; c) experimental series 3 (0.05 mM): bead surface is smooth and signs of degradation can not be detected; (scale bar: 200  $\mu\text{m}$ ).

eksperimentalne serije 1 su se većinom razgradile pri čemu je u rastvoru zaostala značajna količina nerazgrađenih delova čestica, a pojedine čestice koje su još uvek bile cele, imale su jako ispucalu površinu od koje se otkidaju nerazgrađeni delovi (slika 7a). S druge strane, mikročestice iz eksperimentalne serije 2 su većim delom ostale cele ali se i ovde mogu uočiti čestice sa ispucalom i naboranom površinom kao i čestice koje prividno izgledaju netaknuto (slika 7b). Najzad, mikročestice iz eksperimentalne serije 3 se po izgledu ne razlikuju od kontrolnih mikročestica: sferične su, prozirne i glatke (slika 7c).

Da bi se ispitao uticaj bubrenja na mehaničku stabilnost alginatnih mikročestica u uslovima koji imitiraju prirodnu *in vivo* sredinu, mikročestice serije 2 koje su stajale u rastvoru Na-citrata (0.2 mM) 3 i 7 dana su testirane pri dinamičkoj kompresiji pri brzini od 337,5  $\mu\text{m/s}$  do deformacije od 10% u biorektoru sa mehaničkom

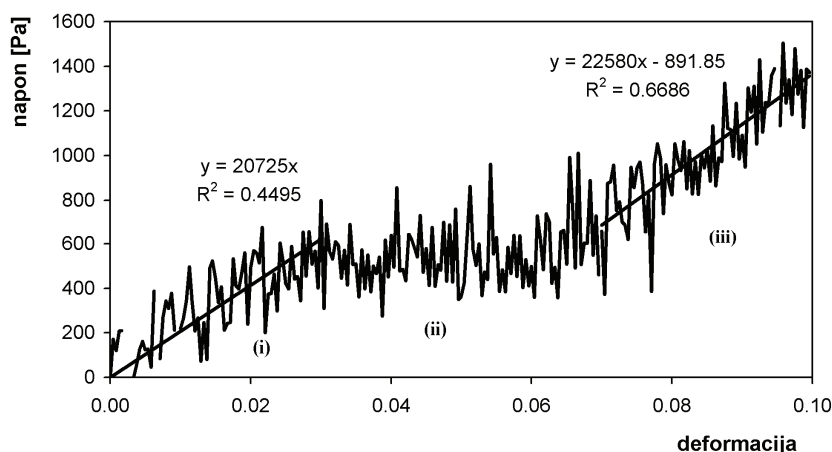
stimulacijom. Na slici 8 prikazane su eksperimentalno određene zavisnosti napona od deformacije za kontrolne alginatne mikročestice (kriva 1) i za mikročestice eksperimentalne serije 2 posle 3 dana eksperimenta (kriva 2). Može se uočiti da obe zavisnosti prate linearan trend pri čemu moduli elastičnosti iznose 136,6 $\pm$ 2,8 i 30,8 $\pm$ 1,3 kPa za kontrolne odnosno alginatne mikročestice serije 2.

Na slici 9 prikazana je eksperimentalno određena zavisnost napona od deformacije za alginatne mikročestice serije 2 posle 7 dana eksperimenta. Ovde se mogu uočiti 3 faze: *i*) linearna zavisnost do deformacije od oko 3%, *ii*) faza konstantnog napona do deformacije od oko 7% i *iii*) faza linerane zavisnosti do krajnje primenjene deformacije od 10%. Primenom linearnog modela na faze *i* i *iii* određeni su moduli elastičnosti za ove dve faze od 20,7 $\pm$ 2,8 i 22,6 $\pm$ 0,9 kPa. Ovakav trend ukazuje da u prvom fazi nabubrele čestice pružaju otpor defor-



Slika 8. Eksperimentalne zavisnosti napona od deformacije za pakovani sloj kontrolnih alginatnih mikročestica (kriva 1) i mikročestica serije 2 nakon 3 dana eksperimenta (kriva 2) i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja).

Figure 8. Experimental stress-strain relationships and best linear fits for packed beds of control alginate microbeads (curve 1) and microbeads from the experimental series 2 after three days in Na-citrate solution (curve 2) (experimental data represent average of  $n = 3$ ).



Slika 9. Zavisnost napona od deformacije za pakovani sloj alginatnih mikročestica serije 2 nakon 7 dana eksperimenta na kojoj se uočavaju 3 faze; faze i i iii su modelovane linearnim zavisnostima (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja).  
Figure 9. Experimental stress–strain relationship for the packed bed of alginate microbeads from the experimental series 2 after 7 days in Na-citrate solution: three phases can be distinguished; phases i and iii are modeled by linear fits (experimental data represent average of  $n = 3$ )

maciji dok ne dođe do njihovog pucanja tako da u drugoj fazi dolazi do nesmetane kompresije sloja do deformacije od oko 7% kada komprimovani sloj, sada već razoreni čestice, ponovo počinje da pruža otpor deformaciji.

## DISKUSIJA

Alginatni hidrogelovi predstavljaju atraktivan biomaterijal za primenu u farmaciji i medicini bilo kao punilac na mestima povrede bilo kao nosač terapeutskih supstanci ili ćelija u regenerativnoj medicini i inženjerstvu tkiva. Pri tome su mikročestice kao oblik nosača naročito pogodne jer omogućavaju mala difuziona rastojanja i jednostavnu implantaciju bez potrebe za hirurškim zahvatima. Pri potencijalnoj primeni alginatnih mikročestica u medicini izdvajaju se dva značajna faktora: mogućnost kontrolisane degradacije i biomehničke karakteristike alginatnog gela kao i pakovanog sloja čestica.

U ovom radu je ispitana mogućnost kontrolisane degradacije alginatnih mikročestica u rastvorima kulture medijuma za ćelije sisara u koji su dodate male koncentracije natrijum-citrata. U prethodnim istraživanjima koja su trajala do 5 nedelja je pokazano da alginatne mikročestice u ovom kultivacionom medijumu bez dodataka citrata ostaju stabilne i približno konstantnog prečnika [9,35,36]. Pri dodatku natrijum-citrata u ispitivanom opsegu koncentracija (0,05 do 0,5 mM) zapaženo je da prvo dolazi do bubrenja čestica, zatim sledi period stabilnosti i najzad, degradacija. Ovi rezultati su u skladu sa mehanizmom razgradnje hidrogela kalcijum-alginata objavljenom u literaturi [17,20,21] po kome joni natrijuma prvo zamenjuju jone kalcijuma vezane za ostatke manuronske kiseline tako da dolazi do bubrenja gela. Modelovanje apsorbovane količine vode u za-

visnosti od vremena u ovom radu je pokazalo da je proces bubrenja alginatnih mikročestica limitiran brzinom ispravljanja polimernih lanaca u toku izmene jona kalcijuma i natrijuma, što je u skladu sa rezultatima ispitivanja bubrenja alginatnih čestica prečnika većih od 1 mm i koncentracije alginata od 2,5 do 4% w/v [20,22,24]. Shodno tome brzina bubrenja čestica u ovom radu je dalje modelovana linearnom zavisnošću od vremena odnosno kinetikom nultog reda i određene su specifične brzine bubrenja za četiri ispitivane koncentracije. Iako je broj eksperimentalnih tačaka stepena bubrenja u ovom radu relativno mali, dobijene vrednosti specifičnih brzina bubrenja su veoma dobro pratile hiperboličku zavisnost od koncentracije jona citrata u rastvoru ( $R^2 > 0,99$ ). Na taj način je omogućeno određivanje maksimalne specifične brzine bubrenja koja je iznosila oko  $0,34 \text{ d}^{-1}$ , što je značajno sa stanovišta poređenja sa rezultatima objavljenim u literaturi. Brzina bubrenja određena u ovom radu je približna brzini bubrenja od oko  $0,18 \text{ d}^{-1}$  izračunatoj na osnovu podataka za promenu mase hidratizanih alginatnih mikročestica (0,6% w/v, odnos M/G = 0,47, prečnik  $500 \mu\text{m}$ ) u toku vremena u »Ringer« rastvoru sa koncentracijom  $\text{Na}^+$  od 130 mM [14]. Ovde treba istaći da ovako određene specifične brzine bubrenja predstavljaju brzinu ispravljanja lanaca polimera najvećim delom usled zamene jona kalcijuma vezanih za manuronske ostatke. U drugim eksperimentalnim uslovima, npr. pri značajno većim koncentracijama antigelirajućih jona može doći do istovremene izmene i jona kalcijuma vezanih za guronske ostatke dovodeći do većih brzina bubrenja. Tako su u prethodnim istraživanjima bubrenja i degradacije prvobitno osušenih alginatnih čestica potopljenih u fosfatne pufere (10 - 100 mM) dobijene značajno veće brzine bubrenja ekvivalentne vrednostima specifičnih brzina bubrenja od 15 pa do  $700 \text{ d}^{-1}$  [20,24,25]. Ova razlika se može

objasniti time što je u navedenim radovima proces bubrenja čestica uključio hidratisanje polimernih lanaca i, istovremeno, raskidanje veza između polimernih lanaca. Pri tome su čestice odmah po dostizanju određenog stepena bubrenja koji se kretao u opsegu od 1,6 do 50, počinjale da gube masu i dolazilo je do pucanja [20,24,25]. I ovi rezultati takođe navode na zaključak da su se tokom bubrenja verovatno istovremeno raskidale veze i između manuronskih ali i guluronskih ostataka za razliku od našeg rada gde je bubrenje verovatno zasnovano prvenstveno na raskidanju veza između manuronskih ostataka, a tek kasnije dolazi i do raskidanja veza između guluronskih ostataka.

Predloženi mehanizam degradacije kalcijum-alginata je potvrđen i izgledom mikročestica posle 10 dana eksperimenta. Naime, pri većim koncentracijama citrata, čestice posle bubrenja i perioda stabilnosti pucaju i raspadaju se na delove koji se zatim znatno sporije razlažu. Može se pretpostaviti da ti delovi sadrže veći udeo GG ostataka sa čvršće vezanim jonima kalcijuma koji se sporo zamenjuju. Uz to, značajno je zapaziti da pri nižim koncentracijama citrata, sastav i struktura pojedinačnih čestica počinju da imaju veći uticaj na brzinu bubrenja što se može zapaziti sa slike 7b gde se uočavaju čestice u različitim fazama bubrenja. To je takođe potvrđeno i većim standardnim devijacijama dobijenim u eksperimentalnoj seriji 3 (slika 4b) što pokazuje da koncentracija natrijum-citrata od 0,05 mM nije bila dovoljna za potpunu izmenu svih jona kalcijuma vezanih za manuronske ostatke već onih lakše dostupnih. Zato je dobijena velika varijabilnost u stepenu bubrenja različitih čestica, a čestice su ostale cele do kraja eksperimenta od 10 dana. Ova zapažanja ukazuju da proces bubrenja zavisi od specifične strukture gela u pojedinačnim česticama i da otpuštanje jona kalcijuma nije uniformno već se odvija iz pojedinih segmenata koji su različito raspoređeni u različitim česticama što je takođe u skladu sa predloženim mehanizmom.

Period stabilnosti čestica u stanju ravnotežnog stepena bubrenja može biti atraktivan za kontrolisano otpuštanje imobilisanih supstanci i u ovom radu su ispitane mehaničke karakteristike pakovanog sloja ovih čestica na početku i na kraju ovog perioda pod uslovima dinamičkog opterećenja koji imitiraju prirodnu *in vivo* sredinu (brzina deformacije od 337,5  $\mu\text{m/s}$ , deformacija od 10%). Modul elastičnosti pakovanog sloja kontrolnih mikročestica od 136,6 kPa je u skladu sa vrednostima modula elastičnosti u opsegu od 115 do 163 kPa objavljenim u literaturi za diskove kalcijum-alginata koncentracije 2 % w/v određenim pri brzinama deformacije od 42 do 83  $\mu\text{m/s}$  [37,38]. Alginatne mikročestice iz eksperimentalne serije 2 tek dostigle ravnotežni stepen bubrenja (posle 3 dana eksperimenta) su pokazale znatno lošije mehaničke karakteristike uz oko 4,4 puta manji modul elastičnosti (30,8 kPa) nego kontrolne mikročestice.

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ispitivanja mehaničke čvrstoće kalcijum-alginatnih hidrogelova pri sukcesivnom ili dužem potapanju u 150 mM rastvor NaCl pri čemu se pokazalo da dolazi do značajnog smanjenja Jangovog modula elastičnosti zavisno od sastava alginata [17,29]. U toku perioda stabilnosti nabubrelih čestica u ovom radu, mehanička čvrstoća se dalje smanjivala tako da je prilikom testiranja pakovanog sloja ovih čestica posle 7 dana eksperimenta došlo do razaranja strukture. Naime pakovani sloj je ispoljio otpor do 3 % deformacije uz modul elastičnosti za oko 33% niži nego kod tek nabubrelih čestica. Posle ove prve faze, pakovani sloj dalje nije davao otpor deformaciji što se može objasniti pucanjem čestica i sabijanjem sloja do deformacije od 7% kada nerazgrađeni delovi čestica počinju da pružaju otpor uz neznatno veći modul elastičnosti (22,6 kPa) nego vrednost određena za cele čestice (20,7 kPa). I ovi rezultati su u skladu sa predloženim mehanizmom razgradnje hidrogelova kalcijum-alginata po kome su nabubrele čestice otpustile jone kalcijuma vezane za MM blokove, a tokom perioda stabilnosti, iako ne dolazi do daljeg bubrenja, struktura i dalje slabi sporom relaksacijom polimernih lanaca. Praktično jednake vrednosti modula elastičnosti sloja mikročestica iz serije 2 posle 7 dana eksperimenta u fazama *i* i *iii* (slika 9) ukazuju da mehanička čvrstina čestica u ovom stadijumu potiče od nerazgrađenih delova gela odnosno GG segmenata sa vezanim jonima kalcijuma.

### Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije na finansijskoj podršci u okviru projekta osnovnih istraživanja br. 142075.

### ZAKLJUČAK

U ovom radu je ispitan mehanizam degradacije alginatnih mikročestica u medijumu za kulture ćelija sisara uz dodatak malih koncentracija natrijum-citrata (0,05 do 0,5 mM). Pri tome su određeni kinetika i stepen bubrenja čestica kao i period do početka degradacije. Uz to, praćene su i mehaničke karakteristike mikročestica pri ravnotežnom stepenu bubrenja u biorektoru sa mehaničkom stimulacijom koji oponaša prirodne *in vivo* uslove dinamičke kompresije u tkivu hrskavice. Dobijeni rezultati su potvrdili mehanizam razgradnje hidrogelova kalcijum-alginata po kome joni natrijuma prvo zamenjuju jone kalcijuma vezane za manuronske ostatke, pri čemu dolazi do slabljenja strukture i bubrenja čestica, a zatim se u drugoj mnogo sporijoj fazi zamenjuju i joni kalcijuma čvršće vezani za guluronske ostatke. U toj fazi dolazi do pucanja čestica i razgradnje na delove koji zaostaju u rastvoru. Čvrstoća nabubrelih čestica potiče od nerazgrađenih delova sa jonima kalcijuma vezanim za GG segmente. Pri tome se bioreaktorski sistem sa mehaničkom stimulacijom pokazao kao



pogodan instrument za evaluaciju biomaterijala u uslovima koji imitiraju prirodnu *in vivo* sredinu. Rezultati dobijeni u ovom radu su značajni sa stanovišta utvrđivanja strukture i mehanizama razgradnje hidrogelova alginata ali i sa praktičnog aspekta projektovanja karakteristika i ponašanja ovih hidrogelova za primenu u sistemima sa kontrolisanim otpuštanjem biološki aktivnih supstanci kao i u inženjerstvu tkiva.

## LITERATURA

- [1] G.T. Grant, E.R. Morris, D.A. Rees, P.J.C. Smith, D. Thom, Biological Interactions Between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model, *FEBS Letters* **32** (1979) 195–198.
- [2] J.E. Melvik, M. Dornish, in: V. Nedović, R.G. Willaert (Eds.), *Focus on Biotechnology: Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2005, pp. 33–53.
- [3] A.D. Augst, H.J. Kong, D.J. Mooney, Alginate hydrogels as biomaterials, *Macromol. Biosci.* **6** (2006) 623–633.
- [4] L. Lum, J. Elisseff, in: N. Ashammakhi, P. Ferretti (Eds.), *Topics in Tissue Engineering*, University of Oulu, Oulu, 2003, pp. 1–25.
- [5] B. Bugarski, B. Amsden, R. Neufeld, D. Poncelet, M.F.A. Goosen, Effect of electrode geometry and charge on the production of polymer by electrostatics, *Can. J. Chem. Eng.* **72** (1994) 517–522.
- [6] D. Poncelet, V.G. Babak, R.J. Neufeld, M.F.A. Goosen, B. Bugarski, Theory of electrostatic dispersion of polymer solution in the production of microgel beads containing biocatalyst, *Adv. Colloid Interface Sci.* **79** (1999) 213–228.
- [7] V. Manojlovic, B. Obradovic, V. Nedovic, I. Leskosek-Cukalovic, B. Bugarski, Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast, *Hem. ind.* **58** (2004) 62–64.
- [8] A. Osmokrovic, B. Obradovic, D. Bugarski, B. Bugarski, G. Vunjak-Novakovic, Development of a packed bed bioreactor system aimed for cartilage tissue engineering, *FME Trans.* **34** (2006) 65–70.
- [9] B. Obradovic, A. Osmokrovic, B. Bugarski, D. Bugarski, G. Vunjak-Novakovic, Alginate microbeads as cell support for cartilage tissue engineering: bioreactor studies, *Mat. Sc. Forum* **555** (2007) 417–422.
- [10] D.E. Orr, K.J.L. Burg, Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications, *Ann. Biomed. Eng.* **36** (2008) 1228–1241.
- [11] O. Smidrod, G. Skjak-Bræk, Alginate as immobilization matrix for cells, *TIBTECH* **8** (1990) 71–78.
- [12] A. B. Lansdown, M. J. Payne, An evaluation of the local reaction and biodegradation of calcium sodium alginate (Kaltostat) following subcutaneous implantation in the rat, *J. Roy. Coll. Surg. Edinb.* **34** (1994) 284–288.
- [13] P. Prang, R. Muller, A. Eljaouhari, K. Heckmann, W. Kunz, T. Weber, C. Faber, M. Vroemen, U. Bogdahn, N. Weidner, The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels, *Biomaterials* **27** (2006) 3560–3569.
- [14] R.E.J. Forster, F. Thurmer, C. Wallrapp, A.W. Lloyd, W. Macfarlane, G.J. Phillips, J.-P. Boutrand, A.L. Lewis, Characterisation of physico-mechanical properties and degradation potential of calcium alginate beads for use in embolisation, *J. Mater. Sci: Mater. Med.* (2010), DOI 10.1007/s10856-010-4080-y
- [15] P. Sriamornsak, R.A. Kennedy, Effect of a small molecule on diffusion and swelling properties of selected polysaccharide gel beads, *Carbohydr. Polym.* **79** (2010) 219–223.
- [16] M. Davidovich-Pinhas, H. Bianco-Peled, A quantitative analysis of alginate swelling, *Carbohydr. Polym.* **79** (2010) 1020–1027.
- [17] I. Donati, Y.A. Morch, B.L. Strand, G. Skjak-Bræk, S. Paoletti, Effect of elongation of alternating sequences on swelling behavior and large deformation properties of natural alginate gels, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 12916–12922.
- [18] H.J. Kong, K.Y. Lee, D.J. Mooney, Nondestructively probing the cross-linking density of polymeric hydrogels, *Macromolecules* **36** (2003) 7887–7890.
- [19] S. Roger, D. Talbot, A. Bee, Preparation and effect of Ca<sup>2+</sup> on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films, *J. Magn. Magn. Mater.* **305** (2006) 221–227.
- [20] A.K. Bajpai, S. Sharma, Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions, *React. Funct. Polym.* **59** (2004) 129–140.
- [21] J. Qin, Gel swelling properties of alginate fibers, *J. Appl. Polymer. Sci.* **91** (2004) 1641–1645.
- [22] V. Pillay, R. Fassihi, In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics, *J. Control. Release* **59** (1999) 229–242.
- [23] A. Rajendran, S.K. Basu, Alginate-chitosan particulate system for sustained release of nimodipine, *Trop. J. Pharm. Res.* **8** (2009) 433–440.
- [24] M.M. Elnashar, M.A. Yassin, A.E.-F.A. Moneim, E.M.A. Bary, Surprising performance of alginate beads for the release of low-molecular-weight drugs, *J. Appl. Polym. Sci.* **116** (2010) 3021–3026.
- [25] J. Zhang, Q. Wang, A. Wang, In situ generation of sodium alginate/hydroxyapatite nanocomposite beads as drug-controlled release matrices, *Acta Biomater.* **6** (2010) 445–454.
- [26] J.L. Doublier, B. Launay, G. Cuvelier, in: M.A. Rao, J.F. Steffe (Eds.), *Viscoelastic properties of food*, Elsevier Applied Science, London, 1992, pp. 371–434.
- [27] M. Mancini, M. Moresi, R. Rancini, Mechanical properties of alginate gels: empirical characterization, *J. Food Eng.* **39** (1999) 369–378.
- [28] M. Mancini, M. Moresi, R. Rancini, Uniaxial compression and relaxation tests on alginate gels, *J. Texture. Stud.* **30** (1999) 639–657.
- [29] M.A. LeRoux, F. Guilak, L.A. Setton, Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions

- and alginate concentration, *J. Biomed. Mater. Res.* **47** (1999) 46–53.
- [30] J. Stojkowska, B. Bugarski, B. Obradovic, u: *Knjiga apstrakata, Osmo konferencija mladih istraživača Nauka i inženjerstvo novih materijala*, Beograd, 2009, p. 22.
- [31] V.A. Nedović, B. Obradović, C.I. Leskošek., O. Trifunović, R. Pešić, B. Bugarski, Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast, *Process Biochem.* **37** (2001) 17–22.
- [32] V. Manojlovic, N. Rajic, J. Djonlagic, B. Obradovic, V. Nedovic, B. Bugarski, Application of electrostatic extrusion – flavour encapsulation and controlled release, *Sensors* **8** (2008) 1488–1496.
- [33] B. Obradovic, D. Bugarski, M. Petakov, G. Jovcic, N. Stojanovic, B. Bugarski, G. Vunjak-Novakovic, Cell support studies aimed for cartilage tissue engineering in perfused bioreactors, *Mat. Sc. Forum.* **453-454** (2004) 549–554.
- [34] M. Petrovic, D. Mitrakovic, B. Bugarski, D. Vonwil, I. Martin, B. Obradovic, A novel bioreactor with mechanical stimulation for skeletal tissue engineering, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **15** (2009) 41–44.
- [35] D. Bugarski, B. Obradović, M. Petakov, G. Jovčić, N. Stojanović, B. Bugarski, Alginate Microbeads as Potential Support for Cultivation of Bone Marrow Stromal Cells, *Mat. Sci. Forum* **494** (2005) 525–530.
- [36] A. Osmokrović, Razvoj bioreaktorskog sistema sa pakovanim slojem alginatnih mikročestica za bioinženjering tkiva hrskavice, *Multidisciplinane postdiplomske studije*, Univerzitet u Beogradu, 2009.
- [37] G.A. Junter, F. Vinet, Compressive properties of yeast cell-loaded Ca-alginate hydrogel layers: Comparison with alginate–CaCO<sub>3</sub> microparticle composite gel structures, *Chem. Eng. J.* **145** (2009) 514–521.
- [38] M.M. Stevens, H.F. Qanadilo, R. Langer, V.P. Shastri, A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering, *Biomaterials* **25** (2004) 887–894.

**SUMMARY****CONTROLLED SWELLING AND DEGRADATION STUDIES OF ALGINATE MICROBEADS IN DILUTE NATRIUM CITRATE SOLUTIONS**Dragana D. Mitrović<sup>1</sup>, Jasmina J. Stojkowska<sup>2</sup>, Bojana M. Obradović<sup>2</sup><sup>1</sup>Galenika a.d., Belgrade, Serbia<sup>2</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Alginate hydrogels are widely used in biomedicine due to alginate availability, hydrophilic nature, biocompatibility and biodegradability. Alginate microbeads are particularly attractive for applications in pharmacy and regenerative medicine due to high surface to volume ratio, low mass transfer limitations and simple implantation by injection. Aim of this work was to investigate possibilities for controlled degradation of alginate microbeads in cell culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium) with Na-citrate added in small concentrations (0.05–0.5 mM). Alginate microbeads (1.5% w/w, 800 µm in diameter) were produced by electrostatic droplet extrusion and evaluated over a period of 10 days regarding appearance, kinetics and degree of swelling as well as biomechanical properties determined in a novel bioreactor with mechanical stimulation under *in vivo*-like conditions in articular cartilage (10% strain, 337.5 µm/s compression rate). In the citrate concentration range investigated, microbeads initially swelled reaching an equilibrium value (~150–170% with respect to the initial mass), upon which they appeared stable for a certain period of time (1 to over 7 days) followed by bead bursting and degradation. This degradation process indicated that Na<sup>+</sup> from the solution initially replaced Ca<sup>2+</sup> bound mainly to COO<sup>-</sup> groups in polymannuronate sequences inducing electrostatic repulsion of polymer chains and, consequently, swelling of the beads. Citrate ions assisted in this process by forming insoluble calcium citrate. Thus, the specific rate of the bead swelling increased with the increase in citrate concentration approaching a maximal value of ~0.34 d<sup>-1</sup>. In the last phase, the beads burst into pieces, which slowly continued to degrade by replacement of Ca<sup>2+</sup> bonded to polyguluronate blocks in the egg-box structure. Compression moduli for packed beds of control, freshly produced microbeads, and microbeads swelled at the equilibrium degree after 3 days of staying in 0.2 mM Na-citrate solution were 136.6±2.8 and 30.8±1.3 kPa, respectively. By day 7 in this solution, the beads still appearing structurally intact, further lost their mechanical strength due to continued polymer chain relaxation so that the compression modulus was 20.7 to 22.6 kPa owed almost solely to undegraded polyguluronate parts. Results of these studies are important from a fundamental standpoint for determination of structure and degradation mechanisms of alginate hydrogels but also from a practical point of view for optimization of hydrogel properties and behavior for potential applications in controlled drug release as well as in tissue engineering.

**Ključne reči:** Alginat • Degradacija Hidrogelova • Bubrenje • Kontrolisano otpuštanje • Bioreaktor sa mehaničkom stimulacijom

**Key words:** Alginate • Hydrogel degradation • Swelling • Controlled release • Bioreactor with mechanical stimulation