

Kontrolirano otpuštanje antibiotika u elektroispredenom polikaprolaktonskom vlaknastom nosaču

Rajić, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:409046>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivona Rajić

**KONTROLIRANO OTPUŠTANJE ANTIBIOTIKA U
ELEKTROISPREDENOM POLIKAPROLAKTONSKOM
VLAKNASTOM NOSAČU**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada : Prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić, FKIT

Doc. dr. sc. Ljerka Kratofil Krehula, FKIT

Prof. dr. sc. Veljko Filipan, FKIT

Zagreb, srpanj 2018.

Zahvaljujem:

Mentorici prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić na izboru teme, stručnom vodstvu, savjetima, strpljenu i pomoći prilikom izrade ovog rada.

Posebna zahvala mojim roditeljima na njihovoj podršci i u dobrim i lošim trenutcima, razumijevanju i pomoći tijekom studiranja.

Hvala mojim prijateljicama i prijateljima na pomoći i strpljenju, bez kojih mi ove godine studiranja ne bi prošle tako brzo i zanimljivo.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Tema rada dio je područja istraživanja koje se provodi u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta "Ciljana izrada prototipa vlaknastog nosača za uzgoj tkivnih stanica kombiniranimelektroispredanjem–COMBOELECTROSPUN", IP-2016-06-6878, financiran od Hrvatske zaklade za znanost.

Sažetak

Elektropredenje kao relativno novija tehnika i pojavom nanotehnologije nalazi sve veću primjenu u odnosu na konvencionalne metode dobivanja vlakana. Elektroispredeni vlaknasti materijali nalaze primjenu u biomedicini i kao nosači lijekova, stoga imaju potencijalni doprinos učinkovitijem i uspješnijem liječenju različitih bolesti. U radu je istražen utjecaj antibiotika Cefuroxim na svojstva elektroispredenog polikaprolaktona (PCL) u cilju sprečavanju infekcija oka nakon kirurškog zahvata. Postupkom elektroispredanja dobiveni su PCL/CFU vlaknasti nosači u koje je dodan CFU u koncentraciji od 1, 2, 5 i 10 mas. %. Vlakna su dobivena elektroispredanjem iz 10 % - tne otopine polikaprolaktona koja je dobivena otapanjem PCL –a u glacijalnoj octenoj kiselini i acetonu u volumnom omjeru 8:2 u koju je dodan odgovarajući postotak lijeka.

Elektroispredanje ovih vlakana provedeno je elektroispredanjem pri naponu 15 – 16 kV, brzine protoka otopine bila je 1 mL/h i udaljenost od vrha igle do kolektora iznosila je 18 cm. Vijeme elektroispredanja je 4h.

Dobiveni matovi s lijekom karakterizirani su sljedećim tehnikama: diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC), infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR), pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) i UV – VIS spektroskopijom pomoću koje se pratilo otpuštanje lijeka iz vlaknastih nosača. Utvrđeno je da se promjer nanovlakana povećava dok se promjer deformacija smanjuje povećanjem koncentracije lijeka. Promjene nastale kod toplinskih svojstava materijala ukazuju na kompatibilnost polimera i CFU. U konačnici izbor koncentracije cefuroxima uz optimizaciju parametara kod elektroispredanja omogućava izradu elektroispredenog materijala prema potrebama u terapiji oka.

Ključne riječi: elektroispredanje, polikaprolakton, Cefuroxim, vlaknasti nosači, tkivno inženjerstvo

Abstract

Electrospinning as a relatively new technique and with evaluation of nanotechnology is finding greater application in fibers preparation compared by conventional methods of fiber preparation. Electrospun fibrous materials find application in biomedicine as drug carriers and therefore has a potential contribution to more effective and more successful treatment of various diseases.

In this work the effect of the antibiotic Cefuroxim (CFU) on the properties of electrospun polycaprolactone (PCL) has been investigated in the aim of prevention of eye infections after a surgical procedure.

Electrospun PCL/CFU fiber scaffolds are prepared by electrospinning with addition of the CFU in concentration of 1, 2, 5 and 10 wt%. First the PCL polymer solution are prepared in a mixture of glacial acetic acid and acetone in a volume ratio of 8:2 by constant stirring of a 10% PCL for 24 and after that in this PCL polymer solution the antibiotic is incorporated.

The processing parameters were: electrical voltage of 15-16 kV, flow rate of 1 mL/h and needle tip to collector distance of 18 cm. The electrospun scaffolds were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and the release of the CFU from the scaffolds is obtained by UV-Vis spectroscopy. It was found that the diameter of the nanofibers increases, the diameter of the beads or deformations is reduced by increasing the drug concentration. Changes in the thermal properties of the material indicate the compatibility of the polymer and CFU. Finally, the choice of cefuroxime concentration allows the production of electrospun material according to the needs in eye therapy.

Keywords: electrospinning, polycaprolactone, Cefuroxim, scaffolds, tissue engineering

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Polimerni biomaterijali	3
2.1.1. Općenito o polimernim materijalima i polimernim biomaterijalima	3
2.1.2. Polikaprolakton kao biorazgradljivi polimer	5
2.2. Elektroispredanje	6
2.2.1. Postupak i osnove elektroispredanja	6
2.2.2. Parametri bitni za proces elektroispredanja	7
2.2.3. Kolektori izrađeni 3D printanjem korišteni za prikupljanje uzoraka tijekom elektroispredanja	10
2.3. Elektroispredeni materijali	12
2.3.1. Struktura i svojstva elektroispredenih vlaknastih nosača	12
2.3.2. Primjena elektroispredenih vlaknastih nosača u tkivnom inženjerstvu	14
2.3.2. Dodavanje antibiotika u elektroispredene vlaknaste nosače	15
2.4. Tehnike korištene prilikom karakterizacije vlaknastih nosača	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijali	18
3.2. Izrada 3D kolektora	19
3.3. Elektroispredanje PCL/CFU otopine	20
3.4. Karakterizacija elektroispredenih PCL/CFU nosača	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Rezultati dobiveni diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) elektroispredenih PCL/CFU vlaknastih nosača	24
4.2. Rezultati FTIR-ATER analize- potvrda kapsulacije antibiotika (CFU) u elektroispredenim PCL/CFU vlaknastim nosačima	27
4.3. Određivanje morfološke strukture PCL/CFU vlaknastih nosača	30
5. ZAKLJUČAK	36
6. LITERATURNI PODACI	37
7. ŽIVOTOPIS	40

1. UVOD

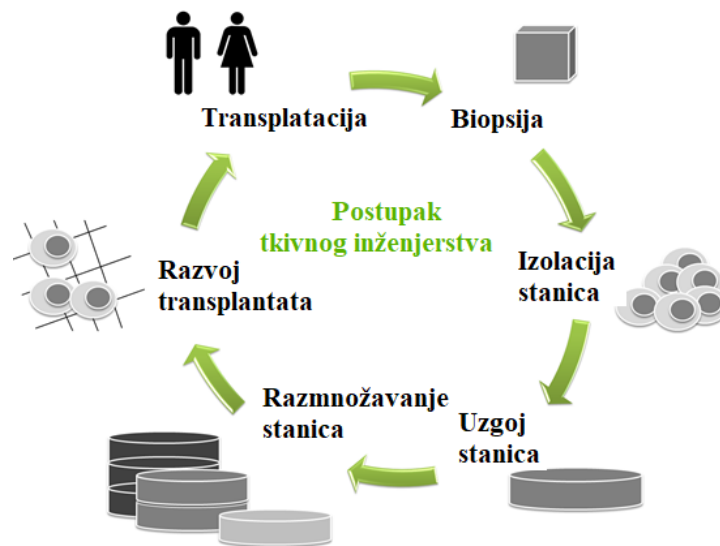
U skorije vrijeme sve je veći interes za uporabu polimernih nanovlakana u biomedicini i biotehnološkim primjenama. Za proizvodnju polimernih nanovlakana koristi se nekoliko načina bio proizvodnje kao što su elektroispredanje, separacija faza, sinteza predložaka, sol gel i dr.. Među tim načinima bio proizvodnje, elektroispredanje, kao jednostavna i svestrana metoda proizvodnje kontinuiranih nanovlakana, ima široki raspon primjene za katalizu, kemijske i biološke senzore, filtracija, inženjerstvo tkiva i dostava lijekova [1]. Elektroispredena nanovlakna pokazuju posebno učinkovit potencijal za dostavu lijeka zbog svoje velike površine, velike poroznosti i međusobno povezane strukture pora. Otpuštanje lijeka može se lako kontrolirati morfologijom i sastavom nanovlakana, a elektroispredeni nosač u kojeg je ispreden lijek može se lako proizvesti u različitim oblicima za regeneraciju rana, krvnih žila i živaca, i slično [2] .

Zbog nagomilavanja plastičnog otpada sve je veća potražnja za ekološki prihvatljivim, biorazgradljivim polimerima kako u svakodnevnom životu tako i biomedicinskim primjenama. Jedan takav polimer je i polikaprolakton (PCL). Polikaprolakton (PCL) je jedan od prvih polimera koje je sintetizirala Carothers skupina u ranim 1930-im. Polikaprolakton je po strukturi hidrofoban i kristalan. Otporan je na utjecaj vode, ulja i otapala, ima dobru fleksibilnost, žilavost, permeabilnost i sposobnost preoblikovanja. Zbog svoje spore razgradnje PCL je pogodan za dužu primjenu, čak i u razdoblju većem od jedne godine. To je dovelo do njegove primjene u pripravi različitih sustava u obliku mikročestica, nanočestica i implantata. Netoksičnost mu omogućuje primjenu u prehrambenoj industriji (u cilju zaštite kvalitete hrane), sprječava oksidativno i mikrobiološko kvarenje hrane, stoga povećava rok valjanosti prehrambenog proizvoda. Koristi se i u medicini, različiti lijekovi su inkapsulirani u PCL-u jer je pogodan za kontrolirano oslobađanje lijeka također se koristi za izradu medicinskih pomagala. Primjenu nalazi i u farmaceutskoj industriji kao ambalaža za pakiranje kozmetičkih proizvoda [3].

Ideja o izradi nosača za tkivnih stanica tj. ideja o tkivnom inženjerstvu proizlazi iz problema poput: nedovoljan broj donora organa, odbacivanje transplantiranog organa kod pacijenta i prijenos patogenih organizama. Tkivno inženjerstvo je tehnika razvijena u svrhu regeneracije

oštećenih bolesnih tkiva ili pak zamjena dijelova ljudskih organa uzgojem stanica *in vitro*. Ova tehnika je izvrstan način za izbjegavanje problema kod transplantacije organa, slika 1.

Svojstva koja su potrebna kod idealnog elektroispredenog nosača su: biokompatibilnost (imunogenost i netoksičnost), nadalje biorazgradljivost (vrlo bitno svojstvo zbog stvaranja novog tkiva, a također nakon razgradnje nusprodukti nisu toksični i nema potrebe od daljnjeg kirurškog zahvata). Poroznost je također vrlo važna jer omogućava vezivanje, kolonizaciju i proliferaciju stanica, kao i otklanjanje otpadnih tvari) i još su bitna mehanička svojstva kako bi se omogućio otpor tijekom rasta novog tkiva [4].



Slika 1. Tkivno inženjerstvo u transplantaciji tkiva.

Nanovlakna dobivena postupkom elektroispredanja koriste se kao nosači za prijenos lijeka i njegovo otpuštanje unutar organizma. U tu svrhu različiti antibiotici koji se koriste u liječenju raznih upala i infekcija moraju biti uspješno kapsulirani u elektroispredena nanovlakna kako bi zadovoljavali uvjete za održiv i vremenski ovisan prijenos lijeka unutar organizma.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Polimerni biomaterijali

2.1.1. Općenito o polimernim materijalima i polimernim biomaterijalima

Polimeri su velike molekule (makromolekule) organskog porijekla sastavljene od ponavljajućih jedinica, odnosno mera (grč.poli-puno i meros-dio). Razlog njihove široke primjene je njihova dobra prerađljivost, niska gustoća te dobra fizikalna, kemijska, mehanička, toplinska i električna svojstva. Polimerni materijali se ubrajaju u najvažnije tehničke materijale današnjice i vrlo rijetko se sastoje isključivo od polimera u izvornom obliku, nego obično sadrže brojne dodatke zbog poboljšanja svojstava. Prerađuju se različitim postupcima preradbe u gotove proizvode, vrlo često i u kombinaciji s drugim polimerima ili drugim vrstama materijala. Osim što služe kao zamjena za uobičajene materijale poput stakla, metala, drva ili keramike, njihov nagli razvoj u 20. stoljeću ubrzao je i napredak mnogih drugih područja ljudske djelatnosti. Prema primjeni polimerni materijali se dijele na konstrukcijske materijale, umjetna vlakna i pomoćne polimerne materijale (folije i filmovi, veziva, ljepila, lakovi, premazi i slično). Najvažniji konstrukcijski materijali su poliplasti, koji se još nazivaju plastičnim materijalima ili plastikom, a mogu se podijeliti u plastomere i duromere, te elastomere [5].

Polimer se sastoji od mnogih jednostavnih molekula ponavljajućih strukturnih jedinica koje zovemo monomeri. Jedna polimerna molekula može se sastojati od stotina do milijuna monomera i može imati linearnu, razgranatu ili umreženu strukturu. Kovalentne veze drže atome u molekulama polimera zajedno, a sekundarne veze zatim drže skupine polimernih lanaca zajedno i tako formiraju polimerni materijal. Kopolimeri su polimeri sastavljeni od dva ili više različitih tipova monomera [6].

Prema podrijetlu polimeri se dijele na:

1. Prirodne polimere (celuloza, škrob, kaučuk, svila, vuna, pamuk,..)
2. Sintetske polimere:
 - a) Prema reakcijskom mehanizmu nastajanja dijele se na:
 - stupnjevite (kondenzacijski)
 - lančane (adicijski)

- b) prema vrsti ponavljanih jedinica
 - homopolimere (jedna vrsta ponavljanih jedinica)
 - kopolimere (više vrsta ponavljanih jedinica)
- c) s obzirom na strukturu polimeri mogu biti:

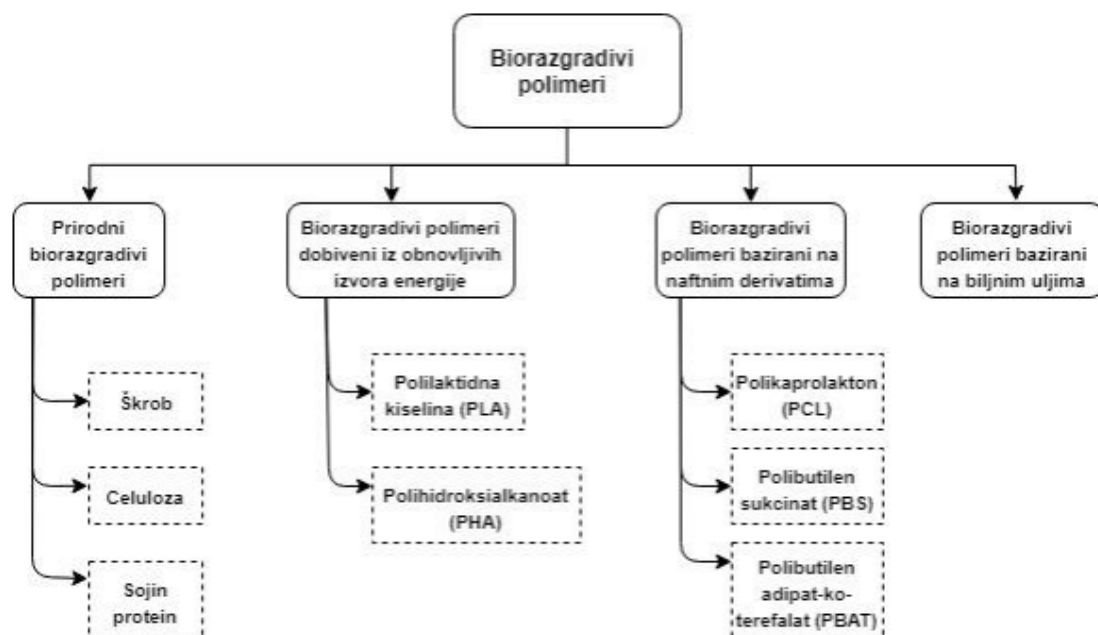
linearni, razgranati, umreženi[7].

Linearni polimeri nastaju povezivanjem monomera u jedan kontinuirani niz ili lanac, tako da je svaki mer povezan samo s dva susjedna mera.

Razgranati polimeri imaju na neke od mera u glavnom lancu vezane kraće bočne lance.

Umreženi polimeri imaju trodimenzijsku prostornu strukturu. Sastoje se od dugačkih lanaca koji su međusobno povezani kraćim poprečnim lancima[7].

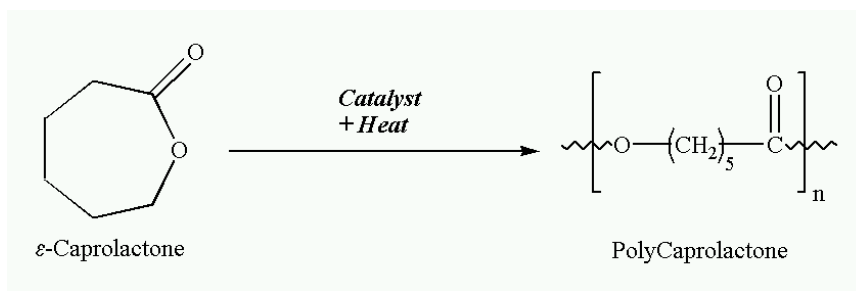
Druga vrsta polimernih materijala su biopolimeri, tj. polimeri koji su biorazgradljivi. Materijali za dobivanje i proizvodnju ovakvih polimera mogu biti obnovljivi (na temelju poljoprivrednih, biljnih ili životinjskih proizvoda) ili sintetski. Četiri glavne vrste biopolimera su škrob, šećer, celuloza i te prirodni polimeri od kojih su načinjeni živi organizmi kao što su polisaharidi, hormoni, fermenti i slično. Razlikuju se četiri osnovna načina kojima se mogu dobiti biopolimeri. Najpoželjniji je da se u jeftine sintetičke polimere doda biorazgradiva ili fotooksidirajuća komponenta. Dakle, miješanjem plastike s punilima (škrob, glukoza) koja su podložna razgradnji pod utjecajem mikroorganizama ili uvođenjem karbonilnih skupina koje apsorbiraju UV-zrake i na taj način iniciraju razgradnju. (fotolitička razgradnja plastike). Drugi, skuplji način, je da se promijeni kemijska struktura polimera dodavanjem hidrolizirajućih ili oksidirajućih grupa u ponavljajući lanac sintetičkog polimera. Treći način je korištenje biopolimera ili njegovih derivata, a najpoznatiji takav materijal je bakterijski polihidroksialkanoat (PHA). Četvrti način je da se stvori nova hidrolizirajuća struktura poliester, polianhidrida i polikarbonata [8]. Sadašnja istraživanja o medicinskim primjenama biopolimera usmjerena su na korištenje biopolimera kao što su PLA, PGA, hitin, kitozan, hialuronan i njihovi derivati i mješavine [9,10].



Slika 2. Podjela biorazgradivih polimera [11].

2.1.2. Polikaprolakton kao biorazgradljivi polimer

Polikaprolakton je bio jedan od najranijih, komercijalno dostupnih sintetskih polimera koji su biorazgradivi imaju dobra mehanička svojstva. Zahvaljujući njegovoj brznoj resorpciji i dugoročnoj razgradnji u prisustvu vode (3 do 4 godine) PCL ima široku primjenu u biomedicinske svrhe. U usporedbi s ostalim alifatskim poliesterima, dobra reološka i viskoelastična svojstva čine PCL jednostavnim za proizvodnju npr. poroznih skeleta, implantata, kao nosači za dostavu lijeka, šavova i zavoja, regeneraciju kardiovaskularnog i koštanog tkiva te regeneraciju živaca [12-15]. Polikaprolakton ima široku primjenu zbog velike fleksibilnosti i biorazgradivosti kao i zbog svoje hidrofobne prirode [16]. Međutim, visoka cijena PCL-a ograničava njegove komercijalnu primjenu. Ovo ograničenje može se prevladati miješanjem PCL-a s biorazgradivim prirodnim biopolimerima, kao što su škrob, celuloza i hitin, kako bi se stvorili novi materijali željenih svojstava [17]. Najviše se koristi škrob jer je obilat, jeftin, obnovljiv i potpuno biorazgradiv [18]. Polikaprolakton se dobiva polimerizacijom otvaranjem prstena ϵ -kaprolaktona u prisutnosti kositrenog oktoata kao katalizatora (Slika 3) [19-22].

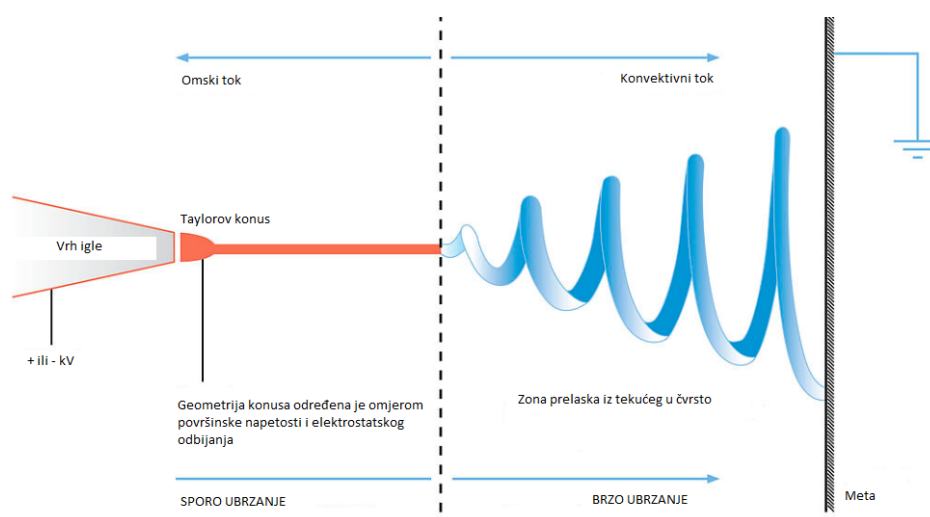


Slika 3. Sinteza polikaprolaktona polimerizacijom otvaranja prstena [19, 20, 21]

2.2. Elektroispredanje

2.2.1. Postupak i osnove elektroispredanja

Elektroispredanje je postupak proizvodnje nanovlakana iz mlaza polimerne otopine u elektrostatičkome polju. Uređaj za elektroispredanje sastoji se od tri osnovne komponente: izvora visokog napona, pumpe i mlaznice (npr. šprica s iglom) i uzemljenog kolektora za prikupljanje vlakana obično metalna ploča ili valjak). Izvor visokog napona nabija otopinu polimera s određenim polaritetom koja zatim biva izbačena prema kolektoru suprotnog polariteta. Shematski prikaz postupka elektroispredanja prikazan je na slici 4 [23].



Slika 4. Formiranje vlakana elektroispredanjem [25]

Sam proces elektroispredanja odvija se uvođenjem mlaza polimerne otopine u električno polje visokoga napona. Jedna se visoko naponska elektroda priključi na kapilarni uređaj za elektroispredanje, dok se druga elektroda priključi na zaslon za prikupljanje vlakana – kolektor. Kada se polimerna otopina podvrgne djelovanju električnog polja dolazi do formiranja kapljice na vrhu igle i nakupljanja naboja. Prilikom elektroispredanja, snaga električnog polja savlada kohezivnu silu otopine te dolazi do istezanja kapljice i nastanka mlaza polimerne otopine koji putuje prema kolektoru. Kapljica se isteže u konusnom obliku, koji se naziva Taylorov konus (slika 3). Gibanjem električki nabijenog mlaza prema kolektoru dolazi do ispravanja otapala i oblikovanja suhих vlakana.

2.2.2. Parametri bitni za proces elektroispredanja

Radni parametri vrlo su važni za razumijevanje kako prirode elektroispredanja tako i pretvorbe polimernih otopina u nanovlakna kroz elektroispredanje. Te parametre se može široko podijeliti na: parametre otopine, parametre procesa i parametre okoline. Svaki od tih parametara može utjecati na morfologiju vlakana, te se kontrolom tih parametara mogu dobiti elektroispredena vlakna željene morfologije i promjera.

1. Parametri otopine :

a) Koncentracija

Koncentracije otopine polimera imaju važnu ulogu u formiranju vlakana tijekom procesa elektroispredanja. Mogu se istaknuti četiri kritične koncentracije od niske do visoke :

- Vrlo niska koncentracija – zbog vrlo niske koncentracije dobit će se polimerne mikro (nano) čestice. Ovdje dolazi do raspršenja čestica umjesto elektroispredanja zbog niske viskoznosti i velike površinske napetosti otopine.
- Veća koncentracija - kako je koncentracija nešto veća dobije se smjesa kuglica i vlakana.
- Prikladna koncentracija – kod ovakve koncentracije dobiju se glatka nanovlakna.
- Vrlo visoka koncentracija – pri ovoj koncentraciji vlakna nemaju dimenzije na nanoskali, odnosno dobiju se mikro – vrpce u obliku spirale.

Povećavanjem koncentracije otopine povećava se i promjer vlakana ukoliko je koncentracija pogodna za elektroispredanje. Također promjenom koncentracije otopine može se dobiti željena viskoznost.

b) Molekulska masa

Molekulska masa ima važan utjecaj na morfologiju elektroisprednih vlakana budući da je ona odraz zapleta polimernih lanaca u otopinama, odnosno viskoznosti otopine. Ukoliko je koncentracija stalna a smanjuje se molekulska masa umjesto glatkih vlakana formirat će se kapljice. Ako se molekulska masa poveća dobiju se glatka vlakna, a daljnim povećanjem mikro – vrpce.

c) Viskoznost otopine

Za viskoznost otopine može se reći da je ključna za određivanje morfologije vlakana. Dokazano je da se kontinuirano i glatko vlakno ne može dobiti pri vrlo niskim viskoznostima, dok vrlo velika viskoznost rezultira jakim izbacivanjem mlaznica iz otopine što znači da moramo imati prikladnu viskoznost za elektroispredanje. Viskoznost otopine može se prilagoditi podešavanjem koncentracije otopine polimera te se mogu dobiti različiti proizvodi. Važno je napomenuti da su viskoznost, koncentracija polimera i molekulska masa polimera međusobno povezane.

d) Površinska napetost

Otkriveno je da različita otapala mogu pridonijeti različitim površinskim napetostima. Sa stalnom koncentracijom, smanjujući površinsku napetost, mjehurići polimera mogu prijeći u glatka vlakna. Također je dokazano da se površinska napetost, ali i viskoznost otopine, mogu prilagoditi mijenjanjem omjera masenog udjela otapala i morfologije vlakana. Može se reći da površinska napetost definira gornju i donju granicu prozora elektroispredanja, ukoliko su svi ostali parametri konstantni.

e) Provodljivost/gustoća površinskog naboja

Vodljivost otopine uglavnom je određena vrstom polimera, otapala ili soli. Obično su prirodni polimeri u prirodi polielektrolitički i u njima ioni povećavaju sposobnost nošenja naboja polimernog mlaza, podvrgavajući se višoj napetosti pod električnim poljem što rezultira slabo

formiranim vlaknima. Električna vodljivost otopine polimera može se prilagoditi dodavanjem ionskih soli poput KH_2PO_4 , NaCl i slično. Pomoću takvih ionskih soli mogu se dobiti nanovlakna s malim promjerom. Ponekad se može postići i visoka provodnost otopine upotrebom organskih kiselina kao otapala. Prema istraživanjima, dobiveni podaci upućuju na to da povećanje vodljivosti otopine pogoduje formiranju tanjih vlakana.

2. Procesni parametri

a) Napon

Primjenjeni napon ključni je čimbenik unutar procesa elektroispredanja. Do izbacivanja nabijenih mlaznica polimera iz igle može doći samo ukoliko je primjenjeni napon veći od praga napona. Neka istraživanja pokazala su da veći naponi mogu povećati elektrostatsku odbojnu silu na nabijenom mlazu, te dolazi do sužavanja promjera vlakana. Također su određena istraživanja pokazala da veći naponi pogoduju stvaranju kapljica polimera. Tako se može utvrditi da napon utječe na promjer vlakana, ali jačina utjecaja ovisi i o koncentraciji polimerne otopine kao i o udaljenosti između vrha igle i kolektora.

b) Protok

Brzina protoka polimera unutar štrcaljke je još jedan važan parametar elektroispredanja. Uglavnom se preporučuje manja brzina protoka jer će tako polimerna otopina imati više vremena za polarizaciju. Ako je brzina protoka vrlo visoka formirat će se vlakna debelog promjera zbog kratkog vremena sušenja, odnosno brzog dolaska na kolektor, i niskih snaga istezanja, umjesto glatkih vlakana s tankim promjerom.

c) Kolektori

Pri procesu elektroispredanja kolektori obično djeluju kao vodljivi supstrati za sakupljanje nabijenih vlakana. Aluminijska folija se općenito koristi kao kolektor, ali je problem što je teško prenijeti sakupljena nanovlakna na druge supstrate za različite primjene. Zbog potrebe prijenosa vlakana razvijaju se razni kolektori kao što su žičana mreža, klin, rešetke, paralelna ili rešetkasta šipka, rotirajuće šipke ili kotač, tekuće kupke i razni drugi.

d) Udaljenost (H) između vrha štrcaljke i kolektora

Udaljenost između vrha štrcaljke i kolektora također može utjecati na promjer vlakana i njihovu morfologiju. Ako je udaljenost premalena, vlakna neće imati dovoljno vremena da se skrutnu, odnosno osuše, prije nego stignu do kolektora, a ako je udaljenost prevelika mogu se dobiti vlakna u obliku kuglica. Važan je fizički aspekt da se ispari otapalo pri formiranju vlakana te se preporučuje optimalna udaljenost.

e) Parametri okoline

Parametri okoline, kao što su vlažnost i temperatura, mogu također utjecati na promjer i morfologiju vlakana. Dokazano je da povećanjem temperature nastaju vlakna manjeg promjera. Kod vlažnosti, niska vlažnost može potpuno osušiti otopinu i povećati brzinu isparavanja otapala. Visoka vlažnost dovest će do formiranja vlakana debelog promjera jer se naboj na mlazu može neutralizirati, a sile istezanja postati male [24].

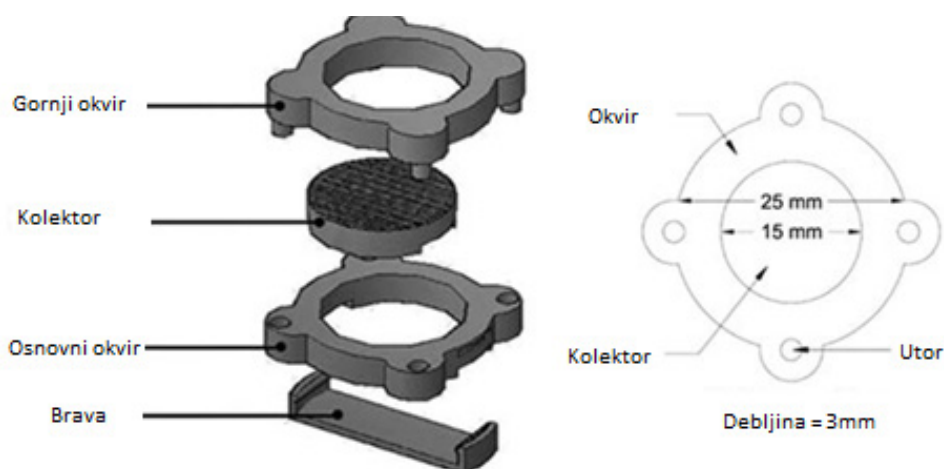
2.2.3. Kolektori izrađeni 3D printanjem korišteni za prikupljanje uzoraka tijekom elektroispredanja

Dokazano je da nanovlakna prikupljena na 3D printanim kolektorima s različitim orijentacijama i poravnanjima mogu dati strukturu takvu da oponaša prirodno okruženje izvanstaničnog matriksa. Rogers i suradnici predstavili su metodu za izradu 3D kolektora sa različitim geometrijama pomoću metode brzog prototipa. Nakon toga proizvedena je 3D modelirana sinusoidalna PLGA elektroispredena skela s nasumičnim i kontroliranim 3D mikroopremama. U sljedećem koraku procijenjen je učinak proizvedenog uzorka skele na vezanje i proliferaciju stanica fibroblasta. Iz dobivenih rezultata se vidjelo da su fibroblasti vezani za usklađena PLGA mikrovlakna sinusnih valova bez prodiranja stanice. Ova i još neke slične metode sposobne su kontrolirati i proizvoditi sinkronizirana nanovlakna, ali imaju određene nedostatke kao što su trajnost proizvoda i nepreciznost. Provedeno je istraživanje kako bi se razvila nova metoda koja će osigurati brzu, točnu i kontroliranu 3D kolektorsku proizvodnju. Glavni cilj ovoga istraživanja bio je kombinirati tehnologiju 3D ispisivanja i proces elektroispredanja kao novu metodu za proizvodnju visoko orijentiranih i nasumično orijentiranih nanovlakana unutar 3D kostura sa elektrodnom skelom. Korišteni su različiti 3D kolektori dobiveni tehnikama 3D printanja pri elektroispredanju kako bi se proizvela poliamid

– 66 (PA – 66) skela. Predložen je dizajn okvira koji je proizveden pomoću 3D pisača kako bi se olakšala karakterizacija dobivenih skela. Stanice su imale različito ponašanje pri rastu, ovisno o orijentaciji nanovlakana. Učinkovitost ove metode potvrđena je provođenjem testova kulture stanica pomoću hondrocita. Očekivano je da biološki pokusi u ovom istraživanju mogu ukazivati na sposobnost PA – 66 3D skele da podrži aktivnost stanica. U ovom radu korišten je PolyJet Direct 3D ispis. Modeli okvira i kolektori raznih veličina utora projektirani su pomoću AutoCAD softvera, a zatim preneseni u 3D stroj za pisaču izradu. Postupak 3D ispisa bio je sljedeći :

- Položaj smole na ladici za izradu izračunat je pomoću softvera stroja iz danog CAD modela
- Pisač mlaznice skrućuje tekući fotopolimer i odmah izolira smolu
- Sitni slojevi smole oblikuju 3D model
- Ukoliko su geometrije komplicirane dodaje se mlazni materijal za podmazivanje sličan gelu
- Materijali za podlogu lako se uklanjaju ručno ili vodenim mlazom

Da bi se karakterizirala elektroispredena skela nakon elektroispredanja napravljeni su potporni okviri za čuvanje mreža i izbjegavanje bilo kakve deformacije strukture tijekom postupka karakterizacije. Okviri se koriste kao nosač da bi se olakšalo rukovanje uzorcima za biološki pokus [25].



Slika 5. Primjer 3D pritanog kolektora sa potpornim okvirima [25]

2.3. Elektroispredeni materijali

2.3.1. Struktura i svojstva elektroispredenih vlaknastih nosača

Nanovlakna dobivena postupkom elektroispredanja pokazuju različite jedinstvene osobine i svojstva koja se ne vide u jednodimenzionalnim strukturama dobivenim nekim drugim tehnikama.

2.3.1.1 Dimenzija vlakana i morfologija

Promjer vlakana dobivenih elektroispredanjem prvenstveno ovisi o parametrima ispredanja ali najviše o koncentraciji. Povećanje koncentracije otopine polimera rezultira vlaknima s većim promjerom. U visoko koncentriranim otopinama, uz primarnu populaciju može se proizvesti sekundarna populacija manjih vlakana nakon što koncentracija polimerne otopine prijeđe određenu kritičnu vrijednost. Primjenjeni električni napon drugi je parametar koji utječe na promjer vlakana. Dokazano je da viši naponi rezultiraju otpuštanjem više tekućine, što dovodi do većih promjera vlakana. Međutim, postoji izuzetak kad su polimeri poput svile da se promjer vlakana smanjuje povećanjem primjenjenog napona. Proučavan je i utjecaj vodljivosti otopine polimera na promjer vlakana i utvrđeno je da su međusobno povezani, odnosno veća vodljivost otopine rezultira manjim promjerom vlakana. Taj fenomen je istraživao dodavanjem različitih soli otopini polimera. Dodavanje soli rezultira većom gustoćom naboja na površini mlaza za ispredanje. Također je dokazano da soli s manjim ionskim radijusima proizvode vlakna manjeg promjera i obratno. Može se reći da veća gustoća naboja dovodi do veće mobilnosti iona s manjim radijusima. Također je pokazano da se različita morfologija vlakana može dobiti i promjenom brzine ispuštanja polimerne otopine u određenom električnom polju. Pri manjim brzinama ispuštanja otopine dobiju se vlakna s manjim promjerima, a pri većim brzinama nastaju vlakna relativno velikog promjera.

2.3.1.2. Poroznost

Za različite primjene poželjno je imati porozne površine vlakana. Vlakna dobivena elektroispredanjem su mnogo manjeg promjera nego vlakna dobivena uobičajnim tehnikama proizvodnje vlakana (npr. ekstruzija), i imaju velik omjer površine i volumena. Kod nanovlakana mogu se identificirati dvije vrste pora: pore na, odnosno unutar, svakog vlakna i pore između vlakana nanovlaknaste membrane. Velika gustoća pora može se stvoriti uslijed

zapetljavanja vlakana. U usporedbi s mezoporoznim materijalima, specifična površina vlakana dobivenih elektroispredanjem je manja, ali su pore relativno velike i međusobno su potpuno povezane kako bi se stvorila trodimenzionalna mreža. Poznavanje veličina pora i poroznosti bitno je za određivanje performansi membrana. Veličina pora određuje vrstu tvari koja može proći kroz njih, dok je poroznost mjera protoka kroz membranu. Pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM) može se odrediti veličina pora, ali samo onih na površini vlakna dok se pore ispod površine ne mogu analizirati. Poroznost nanovlakana bitna je za njihovu primjenu u raznim biomedicinskim primjenama. Kako bi se poboljšala poroznost vlakana moguće je elektroispredati polimerne otopine koje u sebi sadrže porogene čestice. Nakon elektroispredanja slijedi selektivno odvajanje porogenih čestica.

2.3.1.3. Površinska struktura

Površina elektroispredanih vlakana je uglavnom glatka, no ovisi i o parametrima ispredanja. Ako je korištena otopina sa niskom koncentracijom ili visokim električnim potencijalom stvaraju se znate strukture koje su znatno grublje od potpuno vlaknastih struktura. Oblik poprečnog presjeka elektroispredanih vlakana obično je kružan. Međutim, u nekim slučajevima mogu imati oblik vrpce. Na taj način dobivaju se ravna, plosnata nanovlakna. Takva vlakna dobivaju se iz polimera velike molekulske mase i velike koncentracije polimernih otopina. Isparavanje otapala se smanjuje porastom viskoznosti otopine, što rezultira mokrim vlaknima koja dospijevaju do kolektora i spajaju se sudarima. Ravna vrpca može se pripisati kolapsu vanjske strukture polimera forme kože koja nastaje na površini mlaza.

2.3.1.4. Konformacija lanaca i kristalnost nanovlakana

Zbog brzog rastezanja električnog mlaza i brzog isparavanja otapala očekivano je da će polimerni lanci doživjeti izuzetno snažne smične sile tijekom postupka elektroispredanja. Takvo brzo rastezanje i skrućivanje može spriječiti da se lanci polimera vrate nazad u njihove ravnotežne konformacije. Kao rezultat toga, elektroispredena nanovlakna imaju viši stupanj molekulske orijentacije. Brzo rastezanje i skrućivanje polimernog mlaza dovodi do još jednog važnog učinka, do usporavanja postupka kristalizacije jer ispruženi lanci nemaju dovoljno vremena za stvaranje kristala. Iako elektroispredeni polimerni lanci nisu kristalinični, vrlo su orijentirani. Međutim nakon toplinske obrade, elektroispredena vlakna pokazala su povećanje kristaliničnosti oko 5% do 6% vjerojatno zbog transformacije nekih orijentiranih molekulskih lanaca iz metastabilnih stanja u kristalna [26].

2.3.2. Primjena elektroispredenih vlaknastih nosača u tkivnom inženjerstvu

Jedno od najbrže razvijajućih područja primjene elektroispredenih polimernih nanovlakana je regenerativna medicina. Tipični pristup u inženjerstvu tkiva je uporaba elektroispredenih skela kao izvanstaničnih matrica ili podloga za stanice koje su im zasijane. Očekuje se da će elektroispredena skela olakšati sidrenje, migraciju i proliferaciju stanica kako bi se stvorila trodimenzionalna struktura tkiva koje treba regenerirati. Elektroispredeni skele su atraktivne za tkivno inženjerstvo jer imaju biomimetička svojstva karakterizirana promjerom vlakana u podmikronskom rasponu, s velikim omjerom površine i volumena, velikom poroznošću, dobrom raspodjelom veličine pora i sposobnošću prilagodbe veličine i oblika. Također se sastav i izrada elektroispredenih skela mogu kontrolirati tako da se dobiju željena svojstva i funkcionalnost [27, 28]. Promjer vlakana ovakvih skela odgovara strukturnim svojstvima izvanstaničnih matrica i imaju red veličine 80-500 μm . Također je dokazano da se biokompatibilnost skela poboljšava smanjujući promjer vlakana [29]. Za rastuće stanice bitna je i orijentacija vlakana. Uočeno je da rastuće stanice imaju tendenciju slijediti orijentaciju vlakana. Proizvodnja izvanstaničnog matriksa veća je na orijentiranim nego na neorijentiranim vlaknima [30]. Jedan od najpoželjnijih proteina u ljudskom tijelu je kolagen. Vlakna kolagena pokazuju atraktivna biološka i strukturna svojstva. Oni prenose snagu, raspršuju energiju, sprječavaju prerano mehaničko propadanje, imaju visok afinitet za vodu, nisku antigenost i dobru kompatibilnost stanica [31]. Elastin je još jedan ključni protein prisutan u prirodnom izvanstaničnom matriksu vezivnog tkiva gdje su elastičnost i odstupanje ključni parametri. Budući da su kolagen i elastin dvije najdominantnije bjelančevine u izvornoj matrici često se koriste kao skele za inženjerstvo skela, sa ili bez sintetičkih polimera [32]. Često se koristi i svileni fibroin koji je stekao ogromnu popularnost u području inženjerstva tkiva. Fibroin pokazuje dobru biokompatibilnost, značajnu kristaliničnost, veliku elastičnost, dobru vlačnu čvrstoću, žilavost i otpornost na neuspjeh u kompresiji. Elektroispredene skele koriste se za ligamente, kosti, za kožni inženjering tkiva, vaskularni inženjering i mnogi drugi [33].

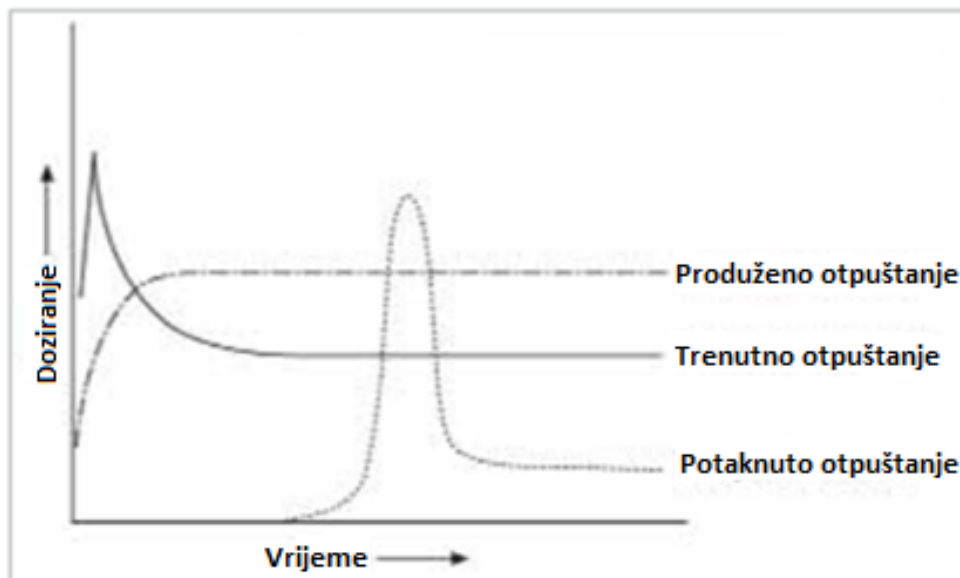
2.3.2. Dodavanje antibiotika u elektroispredene vlaknaste nosače

Elektroispredena nanovlakna nalaze primjenu u biomedicini i kao nosači lijekova, a zadatak im je da osim što mogu inkorporirati u sebe lijek mogu utjecati i na tijek terapije, odnosno mogu doprinijeti kontroliranom otpuštanju lijeka. Način na koji se lijek može inkorporirati u elektroispredeno nanovlakno ovisi o vrsti lijeka i načinu otpuštanja lijeka [34]. Metode koje se koriste su sljedeće: elektroispredanje iz mješavine, elektroispredanje iz emulzije, koaksijalno elektroispredanje i elektroispredanje s naknadnom površinskom modifikacijom elektroispredenog materijala. Analogno, postoje i metode elektroispredanja, međutim u tom slučaju lijekovi su inkorporirani u nanočestice [35]. U slučaju elektroispredanja iz mješavine radi se o postupku u jednom koraku jer se lijek otapa ili dispergira zajedno s polimerom odnosno u polimernoj otopini. Učinkovitost kapsulacije lijeka ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima polimera i lijeka, a o njima ovisi i interakcija između polimera i lijeka, kao i način otpuštanja lijeka. U koaksijalnom elektroispredanju lijek je inkorporiran u jezgri vlakna, a polimer predstavlja ovojnici vlakna. Ovakva metoda svakako utječe na postupno otpuštanje lijeka. Kod elektroispredanja iz emulzije lijek je dispergirani u polimernu matricu odnosno nanovlakno, jer lijek sam po sebi nije topiv u korištenim otapalima. Naknadna modifikacija elektroispredenih vlakana postiže se nanosom bioaktivne komponente na površini nanovlakana koji u sebi nose električni naboj, a s ciljem eliminacije trenutnog otpuštanja lijeka [36, 37].

Lijekovi koji se najčešće inkorporiraju u elektroispredena nanovlakna uključuju: antibiotike, razne antibakterijske agente, antitumorske lijekove i razne biološki aktivne komponente poput: proteina, DNA, RNA i faktore rasta stanica [37].

Na temelju opisanih metoda, a svakako i u ovisnosti o svojstvima polimera i lijeka postoji nekoliko principa otpuštanja lijekova iz elektroispredenih nanovlakana, a to su: trenutno otpuštanje lijeka, postupno otpuštanje lijeka i potaknuto otpuštanje lijeka vanjskim ili sl. utjecajem. Kod trenutnog otpuštanja lijeka, lijek se oslobađa u relativno kratkom vremenu, radi potrebne brze terapije. Kod postupnog otpuštanja lijeka, lijek se oslobađa postupno tj. s malom brzinom i u duljem periodu, jer terapija mora trajati dulje uz manju koncentraciju lijeka. U slučaju potaknutog oslobađanja lijeka, lijek se oslobađa pod utjecajem vanjske stimulacije, a može biti brzo ili postupno oslobađanje prema potrebnoj terapiji. Najčešća stimulacija uključuje: promjenu pH, promjenu temperature, ionsku silu, ultrazvuk i sl. [36,

37]. Na slici 1. dan je primjer krivulja otpuštanja lijeka prema gore opisanim načinima otpuštanja lijekova, a predstavljaju ovisnost koncentracije lijeka u jedinici vremena [37].



Slika 6. Način otpuštanja lijekova.

Dosadašnja istraživanja vezana uz primjenu elektroispređenih nanovlakana kao nosača lijekova (s antibakterijskim ili antitumorskim svojstvima) provedena su in vitro. Stoga je vrlo bitno da se pokrenu i istraživanja prije komercijalizacije ovih materijala, a koja će uključivati analizu kinetike i dinamike otpuštanja lijeka, distribuciju lijeka i analizu toksičnosti na ostale organe, protokole operacija i metabolizam razgradnje nosača odnosno polimera.

2.4. Tehnike karakterizacije

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna pretražna kalorimetrija je tehnika koja mjeri dovedenu ili oslobođenu toplinu uzorka u odnosu na referentni uzorak. DSC zapravo mjeri toplinski tok povezan sa strukturom (amorfna i kristalna) i strukturnim promjenama (prijelazi) materijala. Mjerenje se vrši u kontroliranoj atmosferi uz linearan porast temperature. Prijelazi koji se mjere uključuju: T_g , temperaturu staklastog prijelaza, T_k , temperaturu kristalizacije, T_m , temperaturu taljenja, stupanj kristalnosti, očvršćivanje, kompatibilnost, toplinsku stabilnost, OIT i razgradnju [38].

FTIR spektroskopija

Osnovna primjena IR – spektroskopija je identifikacija nepoznatih supstanci pomoću infracrvenog zračenja. Obično se posmatra apsorpcija u ovisnosti o valnoj duljini. Kako bi došlo do pojave pika atomi i molekule u uzorku moraju titrati (titranje električnog dipolnog momenta) s frekvencijama u IR dijelu EM spektra. Kod spektrometara s Fourierovom transformacijom sve frekvencije se mjere istovremeno i dobiveni interferogram se kompjuterski obrađuje da bi se dobilo traženo frekventno područje. FTIR se može koristiti i za površinsku karakterizaciju. Koriste se valne duljine od 850 do 1300 nm, a razlučivanje površinskih defekata je oko 1 μm .

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

U elektronskom mikroskopu umjesto svjetlosti na objekt koji promatramo pada snop elektrona tako da se na uzorak projicira uzak snop elektrona koji se pomiče po njegovoj površini. Pri tome može doći do raspršivanja elektrona na uzorku ili stvaranja tzv. sekundarnih elektrona (elektroni koji se emitiraju s površine uzorka). Ovi raspršeni i sekundarni elektroni se zatim sakupljaju i detektiraju pomoću posebnog elektroničkog uređaja. Svakom pretraženom dijelu uzorka odgovara jedna točka na ekranu; što veći broj elektrona uređaj detektira, točka je svijetlija. Kako snop elektrona prelazi preko uzorka, na ekranu se stvara slika predmeta sastavljena od mnoštva točaka. Pretražni elektronski mikroskopi koriste se za istraživanje površina jer stvaraju detaljnu i realističnu trodimenzionalnu sliku površine objekta koji promatramo. Budući da atomi različitih elemenata emitiraju karakterističan spektar rendgenskog zračenja, pomoću analize njihovog spektra može se identificirati element i kemijski sastav uzorka.

UV – VIS spektroskopija

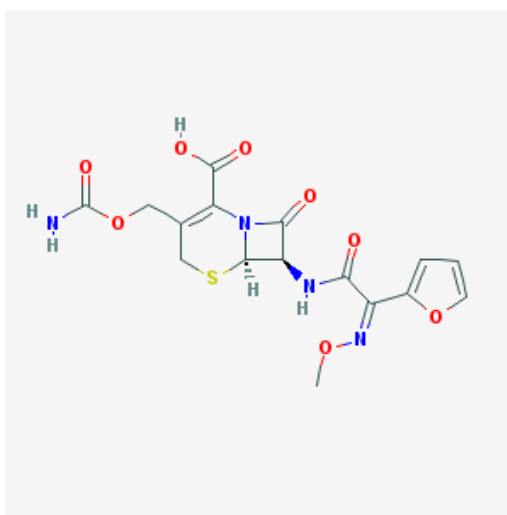
UV spektroskopija je analitička metoda za kvantitativnu identifikaciju različitih tvari kao što su: prijelazni metali, visoko konjugirane organske tvari i biološke makromolekule. Ova tehnika se često ne primjenjuje i u karakterizaciji polimera budući da samo pojedine kemijske veze u molekuli polimera imaju energiju veze koja odgovara valnim duljinama UV zračenja. UV spektroskopija primjenjuje se kod identifikacije nepoznatih komponenata u uzorku kao i za praćenje procesa degradacije polimera, određivanja stabilizatora i aditiva.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Materijali koji su korišteni u ovom radu su polikaprolakton (PCL), molekulske mase 80 000, proizvođača Lach - Ner, antibiotik Cefuroxim (CFU), proizvođača Astro Pharm i otapala: glacijalna octena kiselina i aceton, proizvođača Ru – Ve.

Cefuroxim je antibiotik cefalosporina druge generacije (slika 7). Otkrili su ga Glaxo (danas GlaxoSmithKline) i prvi put prodali 1978. godine kao Zinacef. Dobio je odobrenje od američke Uprave za hranu i lijekove u listopadu 1983. godine.



Slika 7. Struktura Cefuroxima

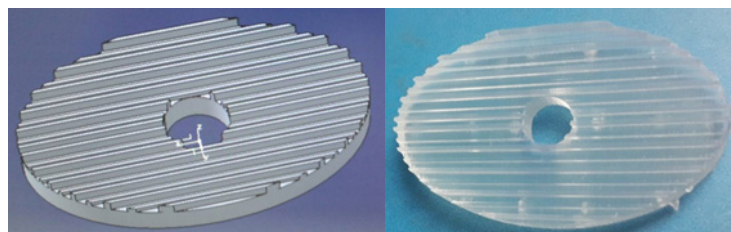
Cefuroxim je općenito dobro podnošljiv i nuspojave su obično prolazne. Ako se konzumira nakon hrane, ovaj se antibiotik bolje apsorbira i manje je vjerojatno da će izazvati najčešće nuspojave poput dijareje, mučnine, povraćanja, glavobolje / migrene, vrtoglavice i bolova u trbuhu u usporedbi s većinom antibiotika u svojoj klasi. Ovaj antibiotik koristi se za lokalno liječenje vanjskih infekcija oka i njegovih adneksa, uzrokovanih osjetljivim bakterijama. Cefuroksim djeluje na: većinu gram-pozitivnih aerobnih bakterija *Staphylococcus aureus* te gram-negativnih bakterija poput *Escherichia coli* i *Salmonella spp*, nadalje na *S. pyogenes*, B-tip streptokoka i sl.

3.2. Izrada 3D kolektora

Model kolektora je prvo dizajniran pomoću programa 123D Design i AutoCAD. Program 123D Design je jednostavan za uporabu i koristi primjenu čvrstih materijala. Postupak se sastoji u tome da se najprije nacrtaju baza odgovarajućih dimenzija. Zatim se na bazu postave pravokutnici određenih dimenzija da se oblikuje kolektor. Utori su se dobili tehnikom copy/paste. Na kraju se dizajnirani kolektor prebaci u format kojeg AutoCAD podržava i nakon toga se svi dijelovi sjedine u jedno tijelo. Kolektori su izrađeni postupkom 3D printanja na Form 2 3D printeru proizvođača FormLabs (slika 8). Za izradu kolektora postupkom 3D printanja korištena je standardna fotoreaktivna prozirna smola na bazi estera metakrilne kiseline i foto-inicijatora. Na slici 9 prikazan je 3D model kolektora i 3D printani kolektor.



Slika 8. Form 2 3D printer proizvođača FormLabs



Slika 9. 3D model i 3D printani kolektor

3.3. Elektroispredanje PCL/CFU otopine

10% - tna polimerna otopina polikaprolaktona dobivena je otapanjem PCL u glacijalnoj octenoj kiselini i acetonu u volumnom omjeru 8:2 uz konstantno miješanje 24h. Antibiotik CFU dodan je u koncentraciji od 1, 2, 5 i 10 mas % u 100 ml pripremljene polimerne otopine uz daljnje miješanje i zagrijavanje na 50°C. Elektroispredanje pripremljenih PCL/CFU otopina provedeno je na uređaju za elektroispredanje (slika 10) NT-ESS-300, NTSEE Co. Ltd. South Korea.



Slika 10. Uređaj za elektroispredanje na Tekstilno-tehnološkom fakultetu u Zagrebu.

Procesni parametri pri elektroispredanju bili su:

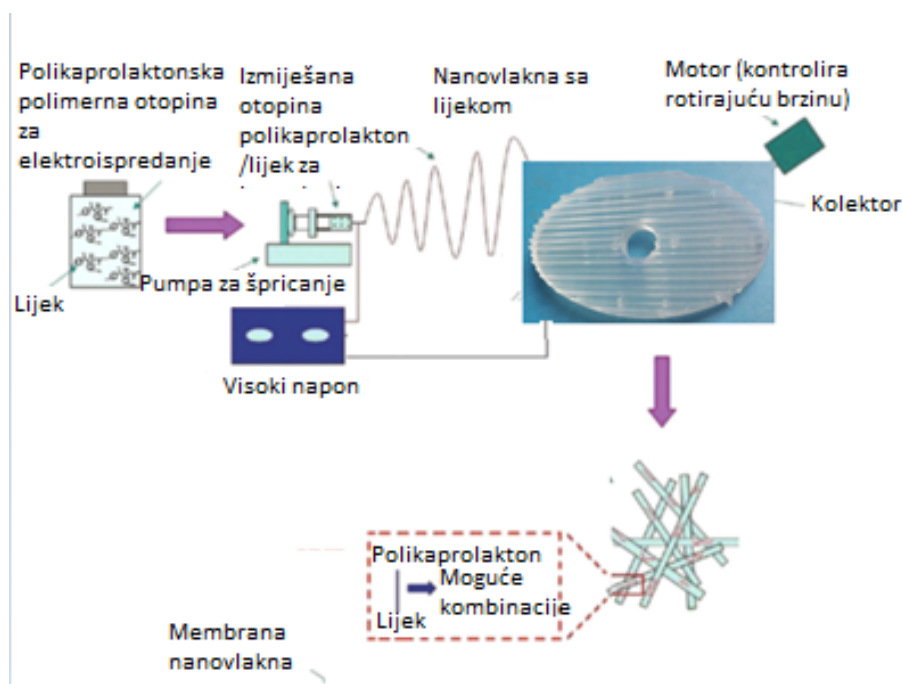
Električni napon od 15-16 kV

Udaljenost od vrha igle do kolektora za prikupljanje vlakana: 15 cm

Brzina protoka polimerne otopine: 1 ml/h

Vrijeme elektroispredanja: 4 sata

Postupak elektroispredanja sastoji se u tome da se polimerna otopina čistog PCL ili PCL/CFU otopina u volumenu od 4 ml stavlja u plastičnu špricu, proizvođača BD plastic, na kojoj se nalazi igla s ravnim vrhom veličine 21 G te se ispreda u vremenu od 4 sata (slika 11) na kolektoru.



Slika 11. Shematski prikaz postupka elektroispredanja PCL/CFU nosača

3.4. Karakterizacija elektroispredanih PCL/CFU nosača

3.4.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Toplinska svojstva određena su na DSC instrumentu Mettler Toledo DSC 822e (slika 12). Uzorci (9-11 mg) zagrijani su od 25°C do 80°C brzinom zagrijavanja od 10°C/min i držani su na toj temperaturi 10 minuta da se „zaboravi“ toplinska povijest uzorka u postupku pripreve. Uzorci su nakon toga ohlađeni na -100°C brzinom od 10 °C/min, nakon čega slijedi ciklus zagrijavanja od -100°C do 80°C. Iz drugog ciklusa zagrijavanja/hlađenja dobivene su vrijednosti faznih prijelaza i entalpije. Hlađenje na niske temperature provedeno je tekućim dušikom. Kroz cijeli eksperiment korišten je inertni plin dušik (40 ml/min.).





Slika 12. DSC analizator Mettler Toledo 822e

3.4.2. FTIR – ATR spektroskopija

Za određivanje kapsulacije Cefuroxima u polimernoj PCL matrici, te utvrđivanje moguće promjene u kemijskim vezama spojeva korištena je FTIR – ATR spektroskopija, FTIR Spectrum One, Perkin Elmer uz ATR komoru (slika 13).



Slika 13. Perkin Elmer, Spectrum One FTIR spektrometar

3.4.3. Pretražni elektronski mikroskop (SEM) – izgled površine nosača

Za određivanje morfologije vlakana te izgled površine elektroispredenih PCL/CFU nosača uzorci su snimljeni na pretražnom elektronskom mikroskopu SEM QUANTA 250, FEI (slika 14). Prije snimanja uzorci su pripremljeni nanošenjem tankog sloja zlata kako bi postali elektrovodljivi. Uzorci su snimljeni s uvećanjima od 5000 puta.



Slika 14. SEM mikroskop QUANTA 250, FEI

3.4.4. UV-VIS spektroskopija, praćenje otpuštanja lijeka iz PCL/CFU nosača

Da bi se odredila količina antibiotika CFU i njegov profil otpuštanja u fiziološkoj otopini korištena je UV – VIS spektrometrija pri 240 nm. Nosači s lijekom (veličine 20 mm x 20 mm) inkubiraju se statički u 10 mL fiziološke otopine (slika 15) nakon čega se količina otpuštenog CFU mjeri na UV – VIS spektrometru.



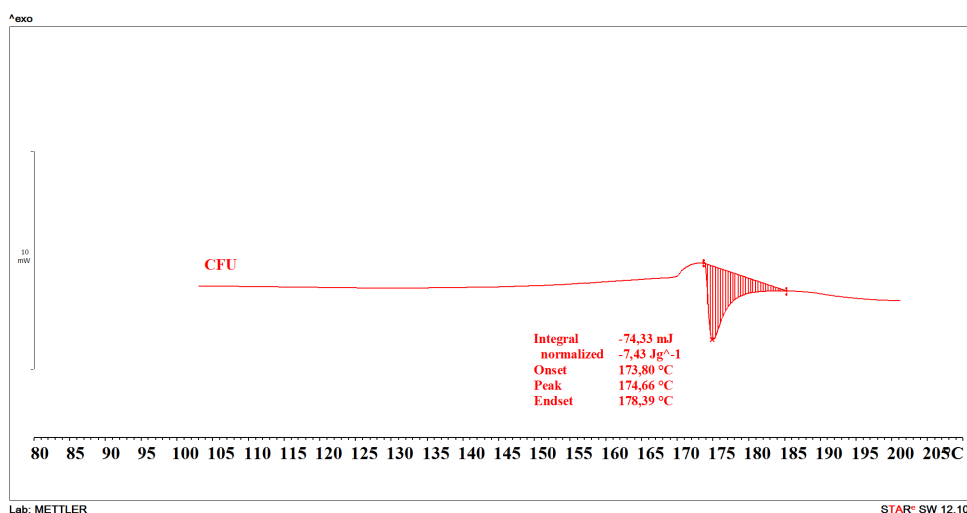
Slika 15. Elektroispređeni PCL/CFU vlaknasti nosač u fiziološkoj otopini

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati dobiveni diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) za elektroispredene PCL/CFU vlaknaste nosače

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) je toplinska tehnika koja mjeri egzotermne i endotermne prijelaze u funkciji temperature. Koristi se za karakterizaciju polimera, farmaceutskih spojeva, hrane, organskih i anorganskih kemikalija, gline, minerala i slično. Prijelaze koje je moguće izmjeriti su temperatura staklastog prijelaza, T_g , temperatura kristalizacije, T_c , temperatura taljenja, T_m i stupanj kristalnosti X_c .

Na slici 16 prikazana je DSC krivulja zagrijavanja za antibiotik Cefuroxim (CFU) od sobne temperature do 200°C kako bi se odredila njegova temperatura taljenja. Dobivena je temperatura taljenja na 174,7°C.



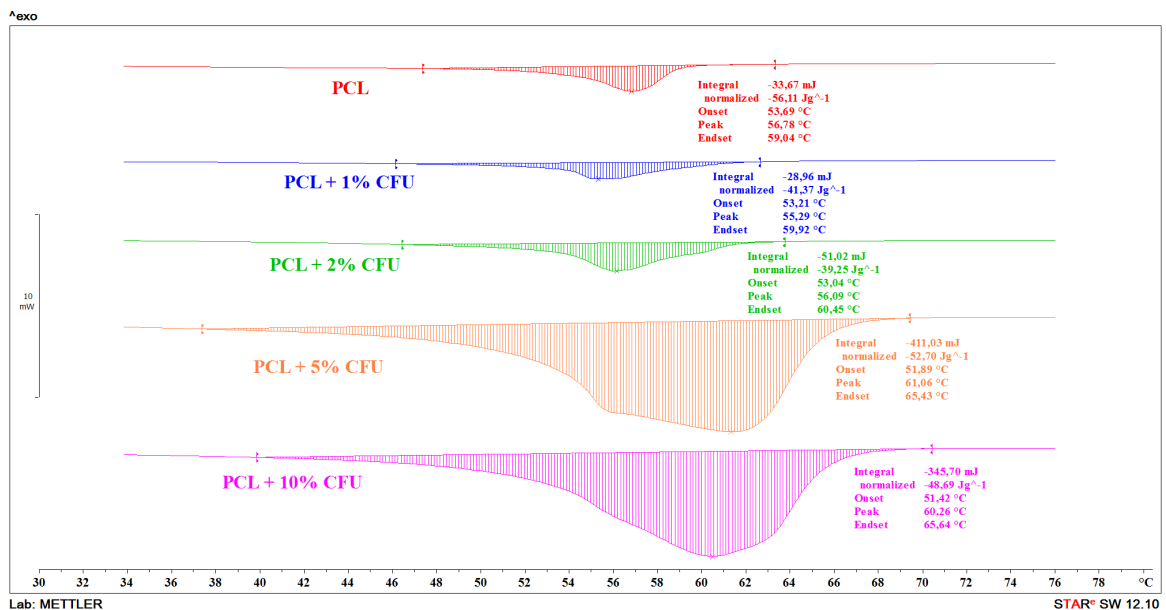
Slika 16. Krivulja zagrijavanja CFU lijeka korištenog u eksperimentu

Na DSC krivulji zagrijavanja čistog PCL vlaknastog nosača (slika 17 a)) dobivena je temperatura taljenja pri 56,8 °C, dok je na krivulji hlađenja dobivena temperatura kristalizacije pri 29,7 °C (slika 17 b)). PCL je semikristalan polimer, što znači da u svojoj strukturi ima i kristalnu i amorfnu fazu. Zbog ograničene rotacije manjih segmenata lanaca ima nisku temperaturu staklastog prijelaza. Amorfna faza PCL-a doprinosi njegovim elastomernim karakteristikama, dok kristalna faza doprinosi uređenosti molekula u kristalnoj strukturi. Obzirom na nisku temperaturu taljenja elektroispredenog PCL vlaknastog nosača

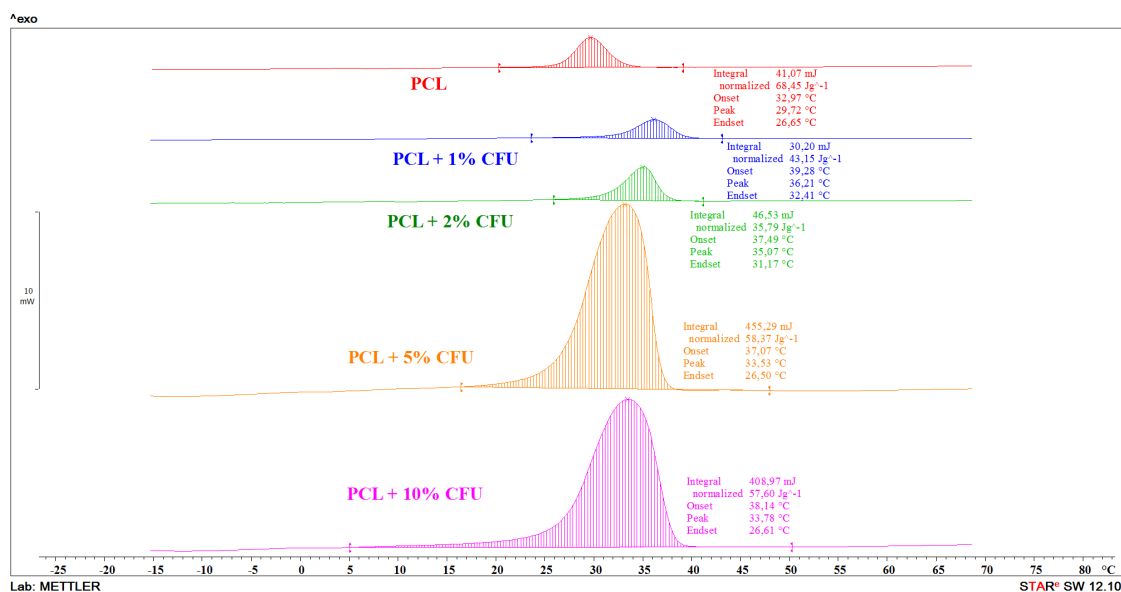
DSC mjerenja provedena su do temperature od 80°C, prethodno je napravljeno mjerenje PCL vlaknastog nosača s lijekom i nije dobivena temperatura taljenja CFU na temperaturi od 174,7°C. Ovaj rezultat ukazuje na potpuno otapanje CFU u PCL polimernoj otopini što se potvrđuje pojavom samo jednog endoternog pika u slučaju elektroispređenih PCL/CFU vlaknastih nosača.

Kako bi se utvrdio utjecaj koncentracije antibiotika CFU na fazne prijelaze i stupanj kristalnosti provedena su DSC mjerenja za elektroispređene PCL/CFU vlaknaste nosače od sobne temperature do 80°C rezultat DSC mjerenja prikazan je na slici 17, a vrijednosti očitane iz DSC krivulja dane su u tablici 1.

a)



b)



Slika 17. Krivulje a) zagrijavanja i b) hlađenja za elektroispređeni PCL i PCL/CFU vlaknaste nosače s različitom koncentracijom CFU

Kod nižih koncentracija CFU (1 i 2 mas. %) utvrđena je neznatna promjena u temperaturi taljenja (T_m), dolazi do smanjenja temperature taljenja za oko 1°C. Smanjenje T_m ukazuje na smanjenje uređenosti kristalne strukture PCL-a dodatkom CFU. Kod koncentracije CFU od 5 i 10 mas.% dolazi do neznatnog povećanja T_m uslijed bolje uređenosti kristalne strukture. Značajniji pomak u temperaturi kristalizacije (T_c) zabilježen je kod svih koncentracija antibiotika što ukazuje na raniji početak kristalizacije dodatkom CFU.

Stupanj kristalnosti, X_c izračunat je prema izrazu (1) iz očitanih vrijednosti entalpija taljenja ($\Delta H_m/Jg^{-1}$) vlaknastih nosača i entalpije taljenja 100% kristalnog PCL – a ($\Delta H^{\circ}_m/Jg^{-1}$) koja iznosi 142,0 Jg⁻¹.

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H^{\circ}_m} * 100\% \quad (1)$$

Iz dobivenih rezultata za X_c prikazanih u tablici 1 vidljivo je da dolazi do smanjenja X_c kod svih koncentracija CFU u odnosu na elektroispređeni PCL vlaknasti nosač. Manje promjene zapažene su kod viših koncentracija CFU (5 i 10 mas.%). Sukladno promjenama

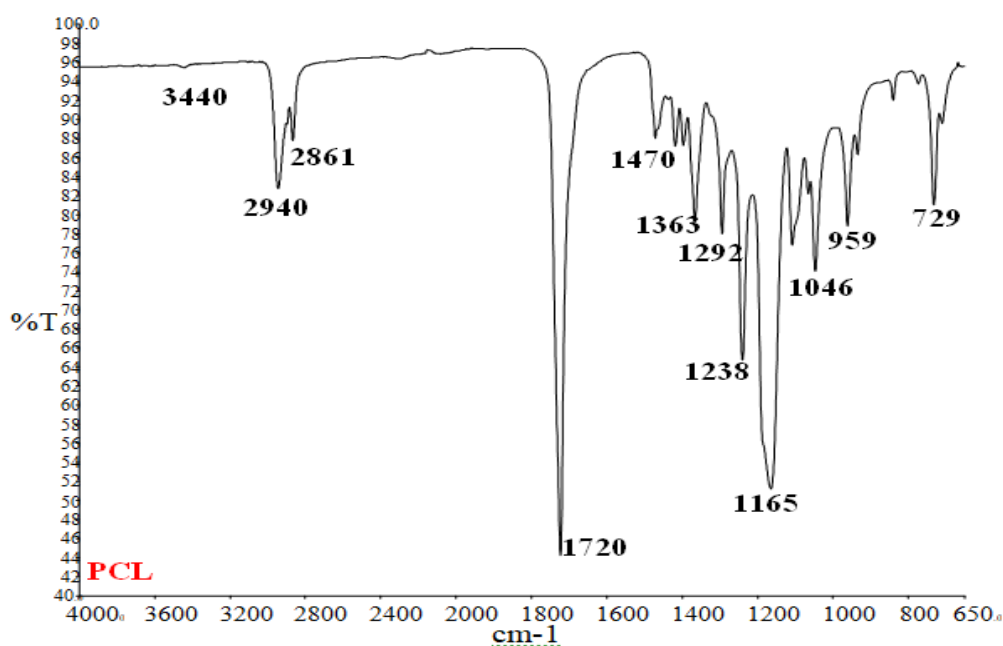
temperaturnih prijelaza i ovdje nije zabilježen trend opadanja stupnja kristalnosti porastom konc. antibiotika, a to može ukazivati na neravnomjernu raspodjelu CFU u vlaknima PCL-a.

Tablica 1. Rezultati dobiveni DSC analizom PCL-a, CFU i PCL/CFU vlaknastih nosača

Uzorak	T_m , °C	T_c , °C	X_c , %
PCL	56,8	29,7	39,51
PCL + 1% CFU	55,3	36,2	29,13
PCL + 2% CFU	56,1	35,1	27,64
PCL + 5 % CFU	61,1	33,5	37,11
PCL + 10% CFU	60,3	33,8	34,29
CFU	174,7	-	-

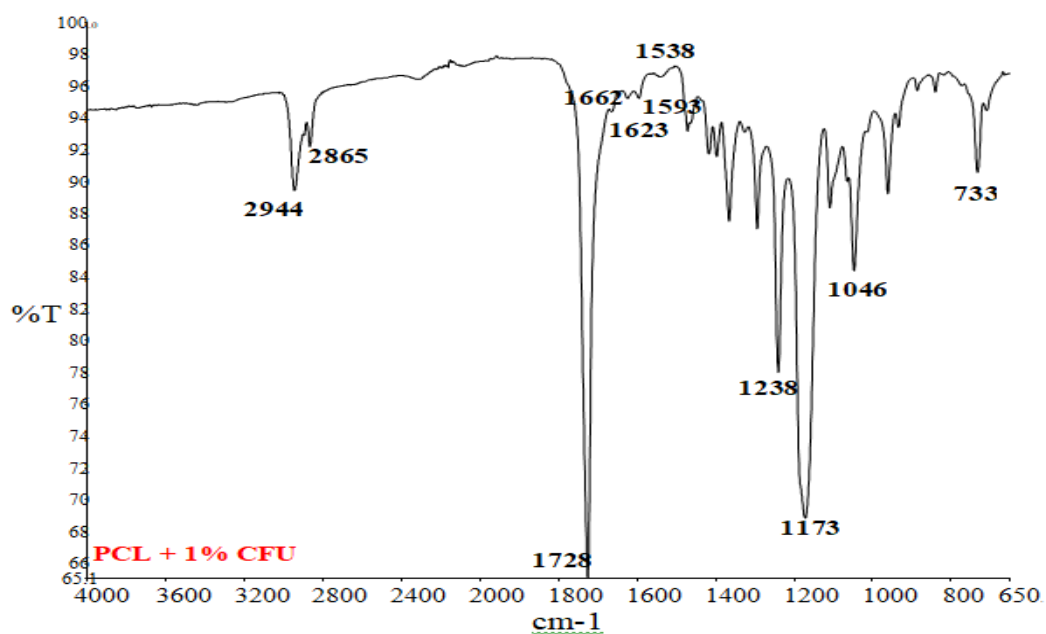
4.2. Rezultati FTIR - ATR analize - potvrda kapsulacije antibiotika (CFU) u elektrosprednim PCL/CFU vlaknastim nosačima

Na slici 18 prikazan je FTIR spektar elektrospredenog PCL vlaknastog nosača. Javlja se karakteristične vrpce na 2940 i 2861 cm^{-1} koje odgovaraju istezanju -CH₂- skupine, vrpca na 1720 cm^{-1} pripisuje se vibracijama istezanja esterske karbonilne skupine (C=O) u amorfnoj fazi [39]. Na 1292 cm^{-1} javlja se vrpca koja odgovara istezanju COO skupine u kristalnoj fazi PCL-a), te su na 1165 cm^{-1} i 729 cm^{-1} vidljive apsorpcijske vrpce vezane za istezanje -CH₂- skupine [40].

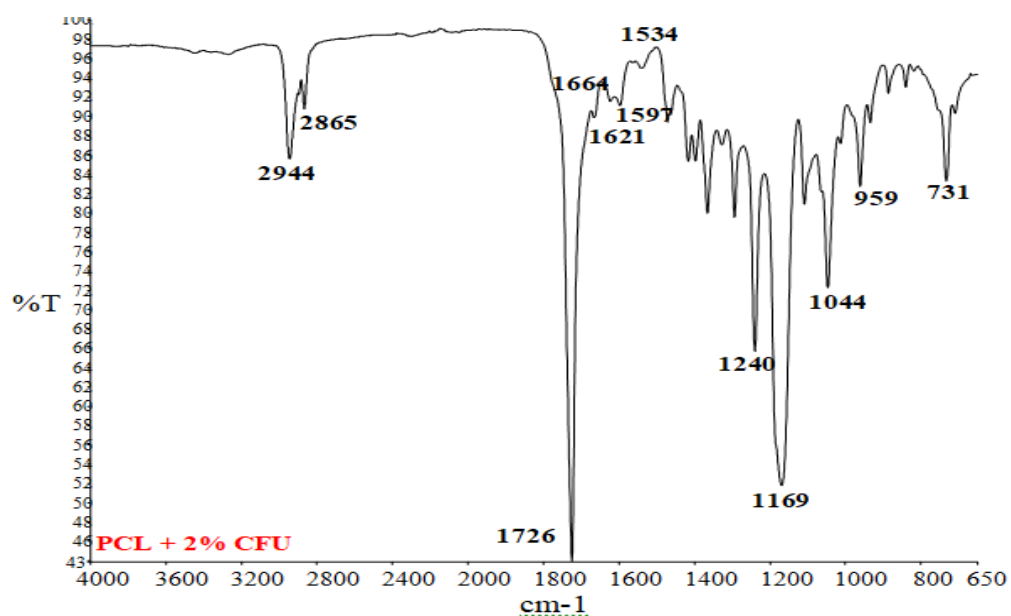


Slika 18. FTIR spektar PCL vlaknastog nosača

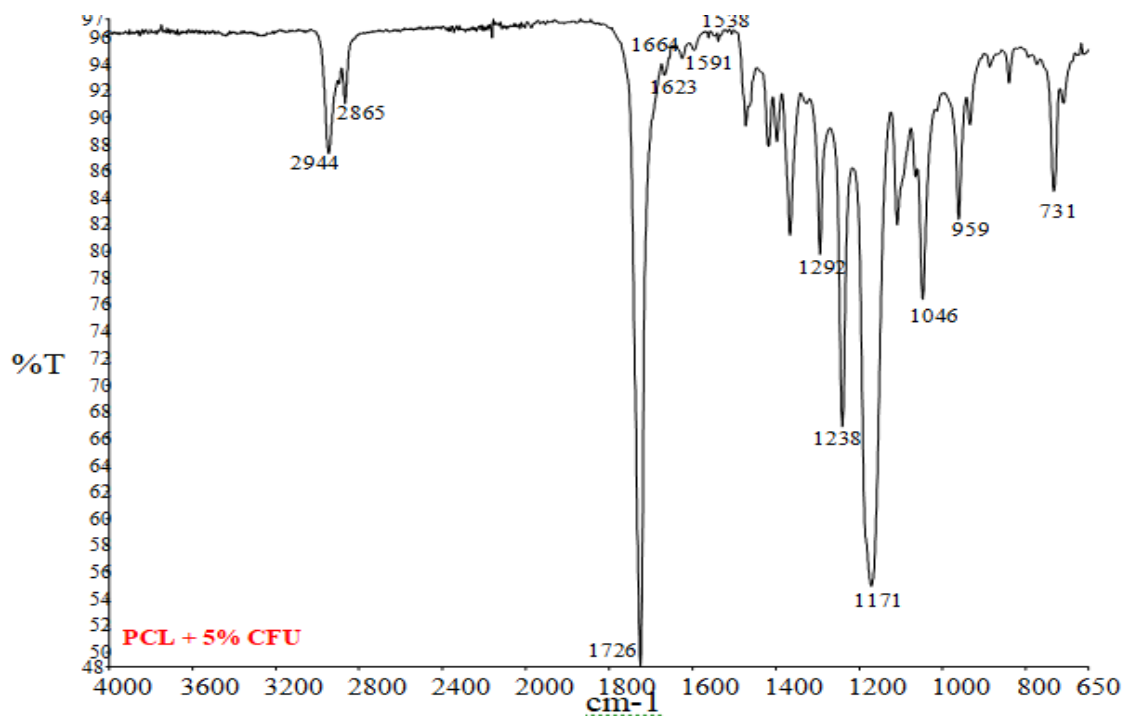
Na slikama 19 do 22 dani su FTIR spektri elektrospredenog PCL/CFU vlaknastih nosača s različitom koncentracijom antibiotika.



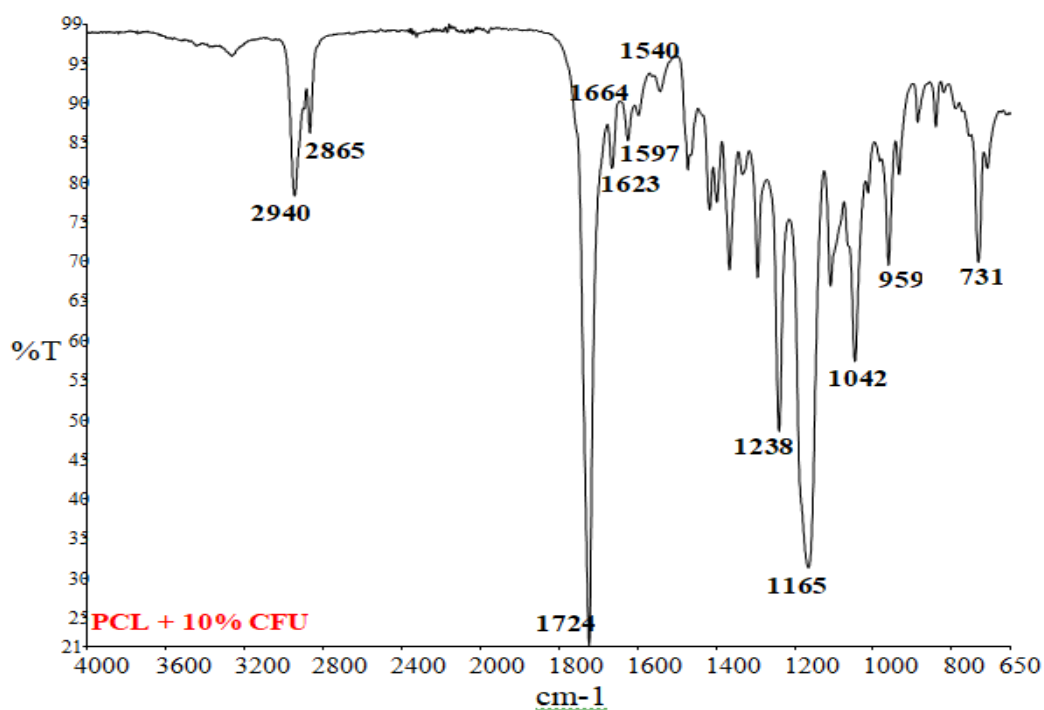
Slika 19. FTIR spektar PCL + 1% CFU vlaknastog nosača



Slika 20. FTIR spektar PCL + 2% CFU vlaknastog nosača



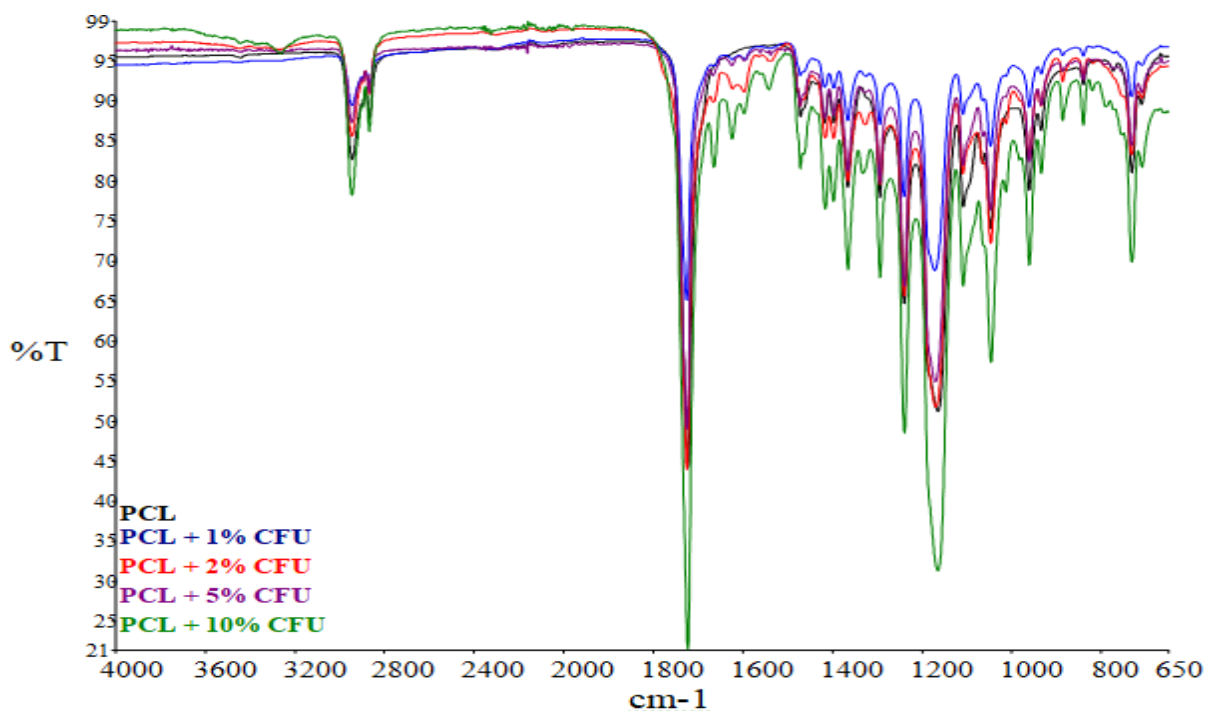
Slika 21. FTIR spektar PCL + 5% CFU vlaknastog nosača



Slika 22. FTIR spektar PCL + 10% CFU vlaknastog nosača

Na FTIR spektrima mješavine PCL – a s antibiotikom zabilježeni su novi karakteristični pikovi pri valnim duljinama od 1538, 1591 i 1623 cm^{-1} koji su vezani za CFU.

Na slici 23 prikazani su FTIR spektri za sve elektroispredene vlaknaste nosače iz kojih se vidi da se intenzitet apsorpcijskih vrpca vezanih za CFU povećava porastom koncentracije antibiotika te je potvrđena kapsulacija antibiotika u PCL elektroisprednim vlaknastim nosačima.



Slika 23. Spektrogram PCL vlaknastog nosača, PCL + 1% CFU, PCL + 2% CFU, PCL + 5% CFU i PCL + 10% CFU vlaknastih nosača

4.3. Određivanje morfološke strukture PCL/CFU vlaknastih nosača

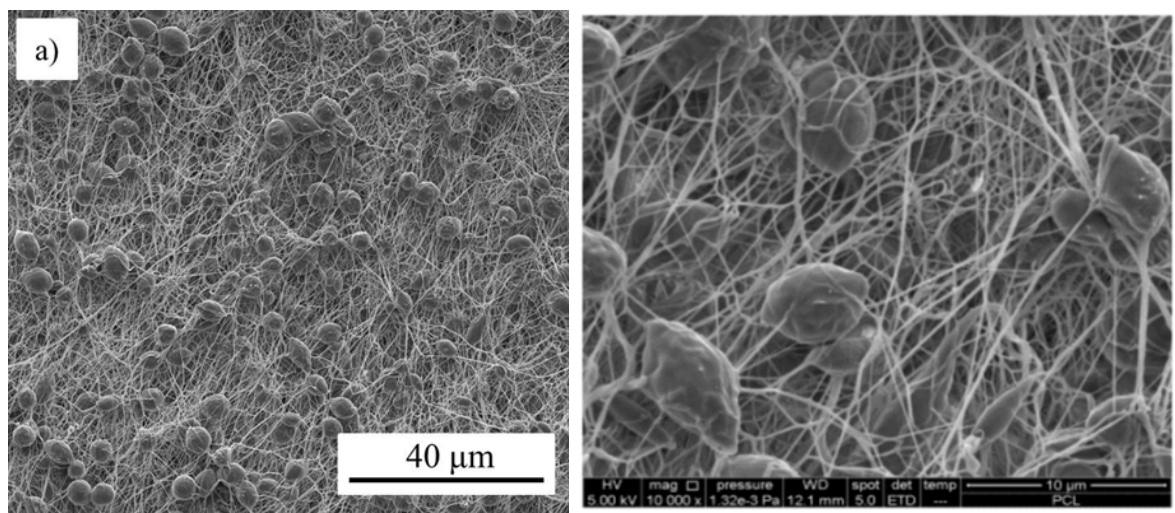
SEM tehnika zasniva se na pretraživanju površine ispitivanog uzorka vrlo precizno fokusiranim snopom elektrona koji pobuđuje elektrone u atomima uzorka. Energija pobuđenih elektrona u uzorku mjeri se na specijalnim detektorima te se računalnom obradom signala stvara pseudoslika. Prije SEM analize izvršeno je neparivanje uzoraka legurom zlata kako bi se povećala električna vodljivost uzoraka.

Postupkom elektroispredanja dobiveni su PCL/CFU vlaknasti nosači s različitim udjelom antibiotika CFU koji imaju primjenu u medicinske svrhe u terapiji oka.

Ovisno o udjelu CFU nastaje različita struktura elektroispredenih vlakana koja je određena primjenom elektronske pretražne kalorimetrije (SEM).

Svi elektroispredeni vlaknasti nosači bez i s dodatkom antibiotika pokazuju poroznu strukturu s nasumičnim rasporedom vlakana s cijevastim oblikom i glatkom površinom.

SEM mikrografija PCL vlaknastog mata prikazana je na slici 24.

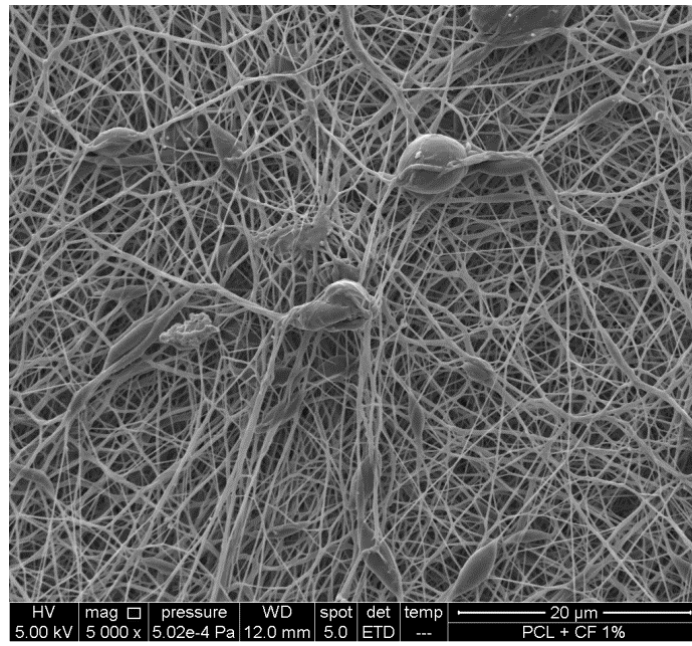


Slika 24. SEM mikrografije elektroispredenog PCL vlaknastog nosača

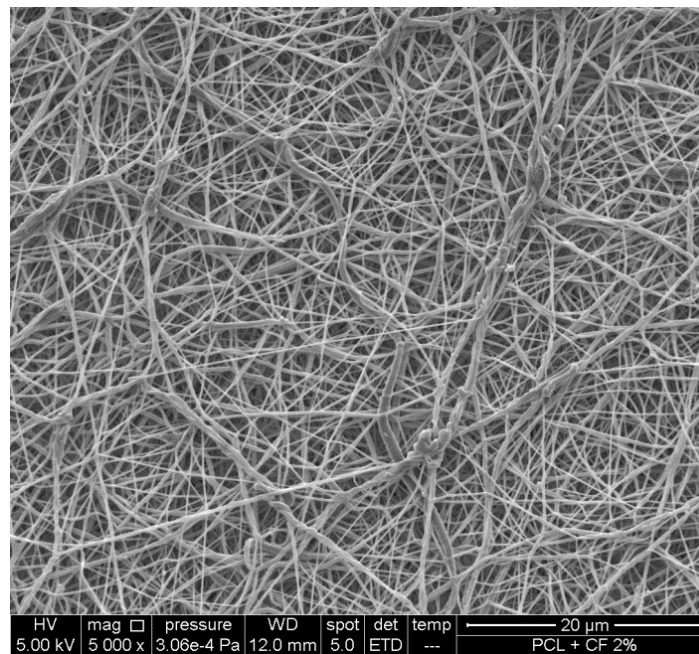
Na SEM slici čistog PCL – a (slika 24) uočene su deformacije (grudice) okruglog oblika po duljini vlakana.

SEM mikrografije elektroispredenih PCL/CFU vlaknastih nosača s različitim koncentracijama antibiotika (1, 2, 5 i 10 mas %) prikazane su na slici 25.

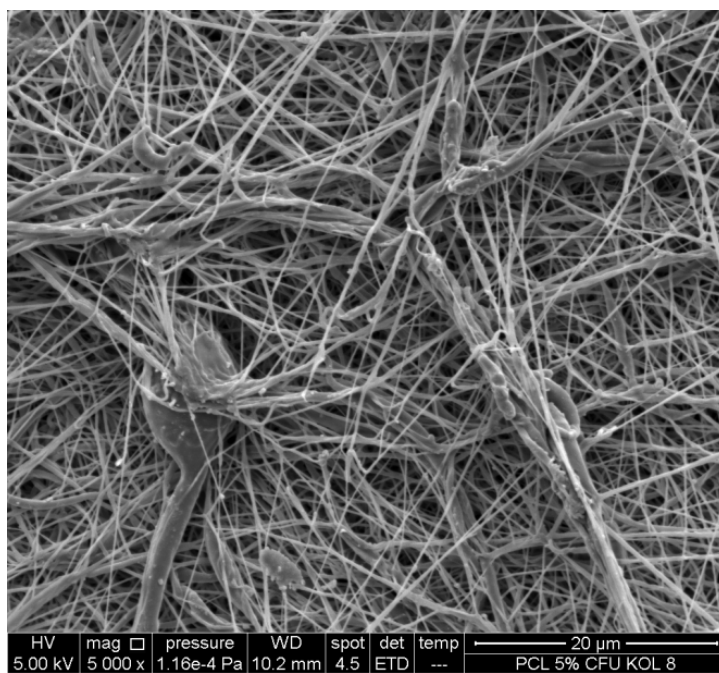
a)



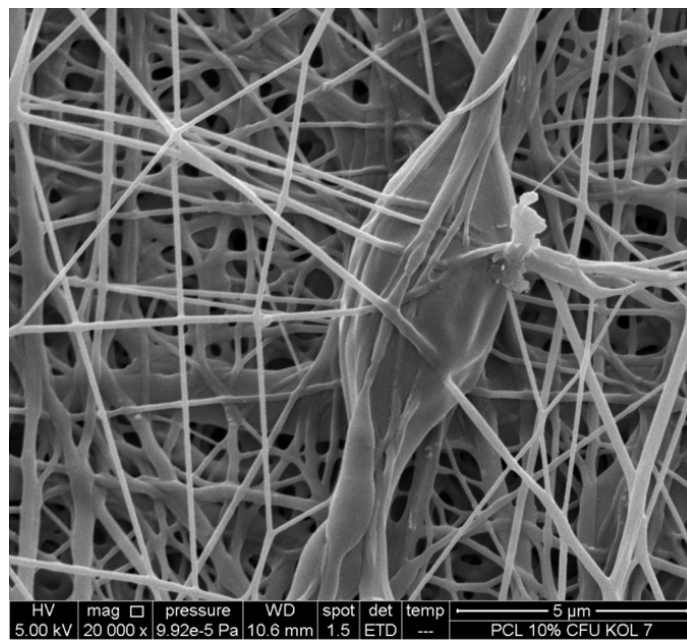
b)



c)



d)



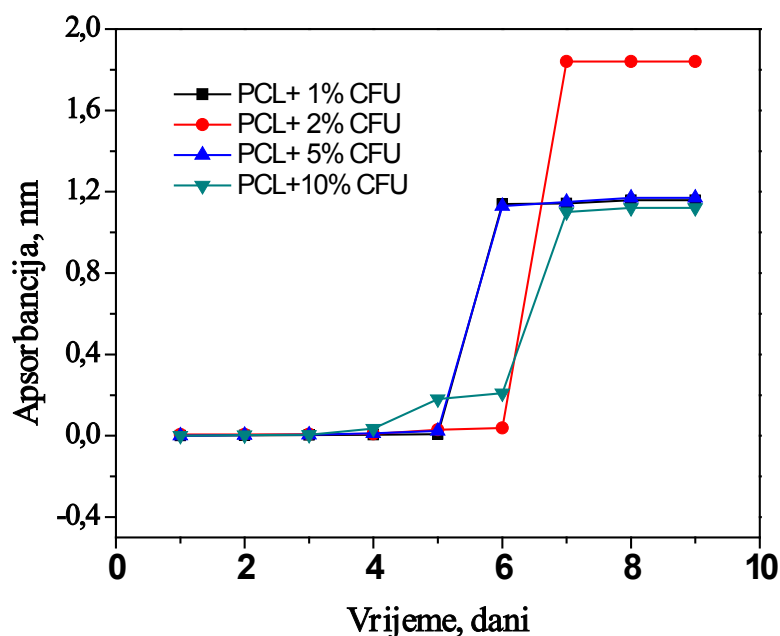
Slika 25. SEM mikrografije vlaknastih matova PCL-a sa dodatkom a) 1% CFU, b) 2% CFU, c) 5% CFU i d) 10% CFU

Vidljivo je da dodatkom CFU u PCL u koncentraciji CFU od 1 mas % (1% PCL/CFU vlaknasti nosač) deformacije prelaze iz okruglog oblika u vretenasti oblik (slika 25 a). Kod PCL/CFU vlaknastih nosača s koncentracijom CFU od 2, 5 i 10 mas % deformacije su potpuno nestale i vlakna poprimaju plosnati i izduženiji oblik (slika 25 b)- 25d).

Može se zaključiti da dodatkom CFU i porastom njegove koncentracije dolazi do povećanja ukupne koncentracije otopine što ima za posljedicu nastajanje vlakana homogenijeg izgleda i s manjim brojem deformacija po duljini vlakna.

4.4. Rezultati praćenje otpuštanja lijeka iz PCL/CFU nosača

Na slici 26 prikazane su krivulje ovisnosti apsorbancije fiziološke otopine o vremenu, uzete nakon svakih 24 sata iz bočica u kojima se nalaze elektroispređeni PCL/CFU materijali.



Slika 26. Ovisnost Apsorbancije fiziološke otopine s otpuštenim antibiotikom o vremenu otpuštanja

Terapija s kapima otopine cefuroxima nakon operacije oka traje od 7-10 tako da je u ovom radu mjerenje izvršeno kontinuirano u trajanju 9 dana.

Na prisutnost otpuštenog antibiotika u fiziološkoj otopini ukazuje promjena apsorbancije s vremenom. Iz vrijednosti prikazanih na krivuljama jasno se vidi da svakim danom dolazi do povećanja apsorbancije kod svih koncentracija antibiotika. Kod elektroispređenog PCL + 2 % CFU materijala porast je bio veći što se može pripisati nehomogenoj kapsulaciji antibiotika u ovom vlaknastom nosaču. Ispostavilo se da PCL/CFU vlaknasti nosači pokazuje veću apsorbancu (nakon dana 5) odnosno nakon 5 dana dolazi do otpuštanja veće količine lijeka iz nosača u fiziološku otopinu. Povećanjem koncentracije CFU produžuje se vrijeme otpuštanja lijeka. Iako rezultati nisu pokazali stabilan trend porasta (odstupanje vlaknastog nosača PCL+2%CFU) svakako su dokaz uspješnom elektroispređanju PCL-a u ulozi tkivnog nosača za prijenos lijekova i kontroliranu terapiju tkiva oka.

5. ZAKLJUČAK

Na krivuljama zagrijavanja PCL/CFU vlaknastih nosača dolazi do pojave samo jednog endotermnog pika, što nam govori da je došlo do potpunog otapanja CFU u polimernoj otopini PCL – a. Pri nižim koncentracijama CFU (1 % i 2 %) u PCL – u vidljivo je da dolazi do smanjenja temperature taljenja, odnosno manja je uređenost kristalne strukture PCL – a. Pri višim koncentracijama CFU (5 % i 10 %) u PCL – u dolazi do povećanja temperature taljenja zbog bolje strukturne uređenosti.

Na krivuljama hlađenja vidljivo je da dolazi do pomaka temperatura kristalizacije na više temperature, što ukazuje na raniji početak kristalizacije dodatkom CFU.

Na FTIR spektrima PCL/CFU vlaknastih nosača zabilježeni su novi karakteristični pikovi koji su vezani za CFU. Porastom koncentracije antibiotika u PCL – u vidljivo je da se povećava i intenzitet apsorpcijskih vrpca vezanih za CFU te je potvrđena kapsulacija antibiotika.

Na SEM mikrografijama vlaknastih nosača PCL/CFU deformacije iz okruglog oblika, koje se javljaju kod čistog PCL – a, se izdužuju i poprimaju plosnati oblik te nastaju vlakna homogenijeg izgleda.

Na krivuljama ovisnosti apsorbancije o vremenu vidljivo je da svakim danom dolazi do povećanja apsorbancije što ukazuje na otpuštanje antibiotika. Također je vidljivo da nakon 5 dana vlaknasti nosači pokazuju veću apsorbancu, odnosno dolazi do otpuštanja veće količine lijeka. Povećanjem koncentracije CFU produžuje se vrijeme otpuštanja lijeka.

6. LITERATURA

- [1] Wang S D, Zhang Y Z, Yin G B, Wang H W and Dong Z H, Fabrication of a composite vascular scaffold using electrospinning technology, *Mater.Sci.Eng, C*, **30** (2010) 670-676.
- [2] Nguyen T T T, Chosh C, Hwang S G, Chanunpanich N and Park J S, Porou core, sheath composite nanofibers fabricated by coaxil electrospinning as a potential mat for drug release system, *Int. J. Pharm.*, **439** (2012) 296-306.
- [3] Muñoz-Bonilla, A., Cerrada, María L., Fernández-García, M., Kubacka, A., Ferrer, M., Fernández-García, M., Biodegradable Polycaprolactone-Titania Nanocomposites: Preparation, Characterization and Antimicrobial Properties, *Sci.*, **14** (2013) 924-926.
- [4] Bosworth, L.: *Electrospinning for Tissue Regeneration* 1st Edition, Woodhead Publishing, 2011, 424. (Agrawal, Ray, 2001; Puppi et al., 2010; Lutolf et al., 2003;)
- [5] National Research Council, *Polymer Science and Engineering : The Shifting Research Frontiers*, Chapter 3. Manufacturing : Material and Processing, 1994., 65-66
- [6]<https://www.ndeed.org/EducationResources/CommunityCollege/Materials/Structure/polym er.htm>, preuzeto 15.06.2018.
- [7] Online Tutorials, Faculty of Science, School of Materials Science and Engineering, Polymers – Polymer Types, Sydney, Australia
- [8] . Albertsson, A.C., Karlsson, S., *Macromol. J., Sci. Pure. Appl. Chem.*, **33** (1996) 1565–1570.
- [9] Nurhan Onar Çamlıbel, *Usage of Biopolymers In Medical Applications*, 2014., 1
- [10] Schnepgroup, *Research in Sustainable Materials Chemistry, Biopolymers*
- [11] Vedran Palfi, *Ispitivanje degradacije biorazgradivog polimera u morskoj vodi*, diplomski rad, Fakultet strojarstva i brodogranje, Sveučilište u Zagrebu, 4
- [12] Herman Francis Mark, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 2017, from Abstract
- [13] Cho, Y. I.; Choi, J. S.; Jeong, S. Y.; Yoo, H. S. *Acta Biomater.* **6** (2010) 4725–4733.
- [14] Natu, M. V.; Gaspar, M.; N.; Ribeiro, C. A.; Correia, I. J.; Silva, D.; de Sousa, H. C.; Gil, M. H. *Biomed. Mater.* **6** (2011) 2500.
- [15] Mondal, D.; Venkatraman, S. S. *Mater. Sci. Eng. C* **31** (2011) 224–229.

- [16] Konsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M., Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*, *Proc Biochem*, **41** (2006) 343-349.
- [17] Nair, L. S.; Laurencin, C. T. *Progr. Polym. Sci.* **32** (2007) 762–798.
- [18] Gunatillake, P. A.; Adhikari, R. *Eur. Cell Mater.* **5** (2003) 1–16.
- [19] Van Natta, F. J.; Hill, J. W.; Carothers, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **56** (1934) 455–459.
- [20] Cayuela, J.; Legaré, V. B.; Cassagnau, P.; Michel, A. *Macromolecules* **39** (2006) 1338–1346.
- [21] Chang, K. Y.; Lee, Y. D. *Acta Biomater.* **5** (2009) 1075–1081.
- [22] Labet, M.; Thielemans, W. *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 3484–3504.
- [23] Nandana, B., Subhas C. Kundu, *Biotechnology Advances*, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, **28** (2018) 325-347.
- [24] Li Z., Wang C., *Electrospinning Technique and Unique Nanofibers, One – Dimensional nanostructures*, 141 (2013) 145.
- [25] Neda, S. H., Nimet B., Nabyl K., Şakir N. Y., Derya Y., Amir H. H., Laurence S., Dominique A., Novel 3D electrospun polyamide scaffolds prepared by 3D printed collectors and their interaction with chondrocytes, *Int. J. Poly. Mat, Poly. Biom.* (2017)
- [26] Koyal, G., Bowlin L. G., *Electrospinning jets and nanofibrous structures, Biomicrofluidics*, 2011.
- [27] Burger C., Hsiao B. S., Chu B., *Annu. Rev. Mater. Sci.* **36** (2006) 333.
- [28] Ashammakhi N., Ndreu A., Yang Y., Ylikauppila H., Nikkola L., and Hasirci V., *J. Craniofac. Surg.* **18** (2007) 3 10.1097/01.scs.0000236444.05345.53
- [29] Boland E. D., Telemeco T. A., Simpson D. G., Wnek G. E., and Bowlin G. L., *J. Biomed. Mater. Res., Part B: Appl. Biomater. B* **71** (2004) 144.
- [30] Lee C. H., Shin H. J., Cho I. H., Kang Y.-M., Kim I. A., Park K.-D., and Shin J.-W., *Biomaterials*, **26** (2005) 1261.
- [31] Kolacna L., Bakesova J., Varga F., Kostakova E., Planka L., Necas A., Lukas D., Amler E., and Pelouch V., *Physiol. Res.* **56** (2007) 51.
- [32] Berglund J. D., Nerem R. M., and Sambanis A., *Tissue Eng.* **10** (2004) 1526.
- [33] Sell S. A., *Biomedical Engineering* (Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, (2009), p. 322.

- [34] Zdraveva, E. i sur., Morfološke karakteristike nanovlaknastog materijala u ovisnosti o koncentraciji punila, Zbornik, RIM 2017 – Development and Modernization of Production / Hodžić, A.; Omer, S. E. ; Hodžić, D. (ur.). Sarajevo: Univerzitet u Bihaću, Tehnički fakultet, 2017, 543-548.
- [35] Cornejo Bravo, J. M. i sur., Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques, Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications, INTECH 2016, 141-155.
- [36] Hu X. i sur., Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications, Journal of Controlled Release **185** (2014) 12-21.
- [37] Rathinamoorthy, R., Nanofiber for drug delivery system—principle and application, PTJ February 2012, 45-48.
- [38] Govorčin Bajsić, E., Karakterizacija materijala, 1.predavanje, Toplinska analiza, Zavod za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju, 2018.
- [39] S. Zhou, X. Deng, H. Yang, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system. Biomaterials. 24 (2003) 3563
- [39] M. Shoja, K. Shambeli, M. B. Ahmad, K. Kalantari, Synthesis and characterization of strontium doped zinc manganese titanate ceramics. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 10(2015) 169-178

