

Karakterizacija 3D elektroispredjenih materijala s različitom geometrijom

Mrkonjić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:149:736716>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nikolina Mrkonjić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nikolina Mrkonjić

KARAKTERIZACIJA 3D ELEKTROISPREDENIH MATERIJALA
S RAZLIČITOM GEOMETRIJOM

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić, FKIT

Prof. dr. sc. Mirela Leskovic, FKIT

Prof. dr. sc. Veljko Filipan, FKIT

Zagreb, srpanj 2017.

Ovaj rad izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju pod vodstvom mentorice, prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić, akademske godine 2016. /2017.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić na prenesenom znanju, stručnim savjetima i uloženom vremenu tijekom izrade ovoga rada.

Također, zahvaljujem prof. dr. sc. Mireli Leskovic na pomoći i brojnim savjetima.

Zahvaljujem se i obitelji i prijateljima što su mi bili podrška tijekom školovanja.

SAŽETAK

Elektroispredanje je tehnika koja koristi elektrostatske sile za dobivanje vlakana promjera raspona od 2 nm do nekoliko mikrometara iz polimernih otopina ili talina. Posljednjih desetljeća sve je veće istraživanje ove tehnike zbog primjene nanovlaknastih struktura kao nosača u tkivnom inženjerstvu. Strategija tkivnog inženjerstva temelji se na popravku i regeneraciji oštećenih tkiva na način da se najprije biopsijom stanice uzimaju iz pacijenta, potom izoliraju i zasijavaju na 3D nosač. Kao nosači se koriste različiti prirodni i umjetni polimeri. U ovom radu korišten je polikaprolakton (PCL) za elektroispredanje nosača različite geometrije. Elektroispredanjem PCL na rotirajućem cilindru nastao je nosač glatke površine koji je korišten kao referentni uzorak. Ostalih šest nosača elektroispredeno je na 3D printanim kolektorima različitih geometrija čime su dobivena tri nosača s paralelnim kanalićima i tri s kvadratnim udubinama. Ova specifična topografija elektroispredanih vlaknastih nosača potrebna je kako bi na njima zasijane fibroblastne stanice rasle i migrirale prema obliku površine nosača stvarajući tkivo određene 3D mikrogeometrije. Morfologija vlakana određena je SEM analizom, raspodjela veličina pora BET metodom, a interakcije na površini metodom mjerenja kontaktnog kuta s vodom. SEM analiza pokazala je veliku poroznost elektroispredanih nosača. BET metodom utvrđeno je da su srednji promjeri pora vrlo mali, ali je specifična površina izrazito velika. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta pokazali su veliku hidrofobnost PCL nosača zbog čega je važno PCL nosače prije primjene obraditi kako bi im se povećala hidrofilnost i poboljšale interakcije stanica i nosača.

Ključne riječi: elektroispredanje, nanovlakna, tkivno inženjerstvo, nosači, polikaprolakton, 3D printani kolektor

ABSTRACT

Electrospinning is a technique that uses electrostatic forces to produce fibers with diameters ranging from 2 nm to several micrometers from polymeric solutions or melts. Over the last decades, there is a growing research of technique because of the application of nanofibrous structures as scaffolds for tissue engineering. The tissue engineering strategy is based on the repair and regeneration of damaged tissues in way that we first take the cells from patient by biopsy, then we isolate and sow on the 3D scaffold. Various natural and synthetic polymers are used as scaffolds. In this study, polycaprolactone (PCL) was used for electrospinning of scaffolds with different geometry. By electrospinning process of PCL a scaffold with smooth surface was formed on rotating cylinder, which was used as a reference sample. The other six scaffolds are electrospun on 3D printed collectors with different geometries, resulting in three scaffolds with parallel ducts and three with quadratic wells. This specific topography of electrospun fibrous scaffolds is required to allow growth and migration of the sown fibroblast cells, forming a tissue of a certain 3D microgeometry. The fiber morphology was determined by SEM analysis, pore size distribution by BET method and interactions on surface were tested by the contact angle measurement method with water. The SEM analysis showed a high porosity of electrospun scaffolds. The BET method determined that the mean pore diameters are very small, but specific surface is very large. The result of the measurement of the contact angle showed a high hydrophobicity of the PCL scaffolds, which makes it important to treat the PCL scaffolds before its application, to increase hydrophilicity and improve the interaction of the cells and scaffolds.

Keywords: electrospinning, nanofibers, tissue engineering, scaffolds, polycaprolactone, 3D printed collector

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Elektroispredanje i modifikacija kolektora u elektroispredanju	2
2.1.1. Karakterizacija elektroispredanih nanovlakana	5
2.1.1.1. Geometrijska karakterizacija	6
2.1.1.2. Kemijska karakterizacija	6
2.1.1.3. Mehanička karakterizacija	7
2.1.2. Vrsta kolektora	7
2.1.3. 3D tisak	9
2.2. Tkivno inženjerstvo	11
2.2.1. Umjetni i prirodni nosači za uzgoj tkiva	13
2.2.1.1. Svila	15
2.2.1.2. Hitozan	16
2.2.1.3. Kolagen	16
2.2.1.4. Hijaluronska kiselina	17
2.2.1.5. Polikaprolakton	17
2.2.1.6. Poli (L-laktična kiselina)	18
2.2.1.7. Polilaktično-glikolna kiselina	18
2.3. Elektroispredani nanovlaknasti nosači za uzgoj tkiva	19
2.4. Poroznost i važnost poroznosti elektroispredanih nosača u tkivnom inženjerstvu ...	19
2.4.1. Metode određivanja	21
2.4.1.1. Gravimetrijska metoda	21
2.4.1.2. Živin porozimetar	22
2.4.1.3. Metoda pomaka tekućine	23
2.4.1.4. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)	24
2.4.1.5. Mikroračunalna tomografija slikanja	25
2.4.1.6. CAD modeli	26
2.4.1.7. Metoda na temelju permeabilnosti	27
2.4.1.8. Kapilarna porometrija	28
2.4.2. Važnost poroznosti kod izrade nosača za uzgoj tkiva	28
3. EKSPERIMENTALNI DIO	32
3.1. Materijali	32

3.2.	Priprema polimernih otopina	32
3.3.	Izrada kolektora pomoću 3D printera	32
3.3.1.	Opis kolektora	33
3.4.	Postupak elektroispredanja	35
3.5.	Karakterizacija elektroispredanih materijala	36
3.5.1.	Elektronskipretražni mikroskop (SEM) – izgled površine nosača.....	36
3.5.2.	Veličina pora i distribucija promjera pora.....	36
3.5.3.	Mjerenje kontaktnog kuta s vodom	37
4.	REZULTATI MJERENJA I RASPRAVA	39
4.1.	Izrada kolektora postupkom 3D printanja	39
4.2.	Određivanje morfološke strukture elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM)..	44
4.3.	Mjerenje kontaktnog kuta s vodom	46
4.4.	Određivanje veličina pora i distribucija promjera pora	50
4.5.	Primjer primjene elektroispredanih nosača	56
4.5.1.	Postupak izolacije i zasijavanja stanica na PCL elektroispredenom nosaču.....	56
5.	ZAKLJUČAK	58
6.	POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	59
7.	LITERATURA	62

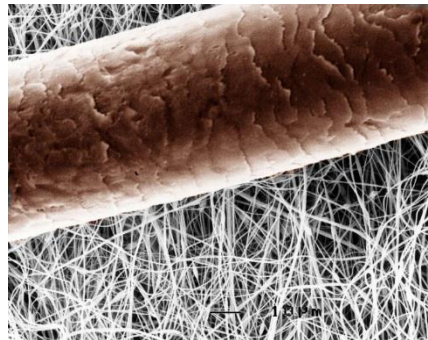
1. UVOD

Nedostaci ljudskih tkiva uzrokovani urođenim manama, povredama ili drugim tipovima oštećenja su svakodnevni problemi s kojima se susreću liječnici. Liječenje se obično usredotočuje na transplantaciju tkiva s jednog mjesta na drugo u istom pacijentu (autograft) ili od jedne osobe, tj. donora u drugu (alograft ili transplantat). Iako su ta liječenja revolucionarna i spašavaju ljudske živote, suočavaju se s brojnim problemima. Zbog toga je došlo do razvoja tkivnog inženjerstva koje ima za cilj popravak i regeneraciju oštećenih tkiva razvojem bioloških nadomjestaka koji vraćaju, održavaju ili poboljšavaju funkciju tkiva. Tkivno inženjerstvo koristi različite prirodne i umjetne biomaterijale kao 3D nosače na koje se zasijavaju stanice ranije uzete iz tijela pacijenta. 3D struktura nosača važna je za oponašanje specifične mikrogeometrije tkiva. Kako bi se dobili nosači točno određene 3D mikrogeometrije i topografije koristi se tehnika elektroispredanja u kombinaciji sa 3D printanjem. Najprije se tehnikom 3D printanja dobivaju kolektori specifične topografije, a zatim se oni koriste u postupku elektroispredanja za prikupljanje vlakana. Elektroispredanje omogućuje proizvodnju vrlo finih vlakana točno određenih svojstava. Vlakna prikupljena na kolektorima oponašaju uzorke kolektora. Na taj način nastaju nosači određene mikro-topografije koja je važna za povezivanje stanica i razvoj novog tkiva. U ovom radu elektroispredeni su PCL nosači na kolektorima različitih geometrija. PCL je načešće korišten poliestar u tkivnom inženjerstvu. Cilj ovog rada je istražiti svojstva 3D elektroispredanih PCL nosača različite geometrije s ciljem njihove primjene za zasijavanje fibroblastnih stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Elektroispredanje i modifikacija kolektora u elektroispredanju

Elektroispredanje je tehnika koja koristi elektrostatske sile za dobivanje finih vlakana iz polimernih otopina ili talina prirodnih ili umjetnih polimera. Tako dobivena vlakna imaju manji promjer, veličina od 2 nm do nekoliko mikrometara, i veću površinu od onih, dobivenih konvencionalnim procesima ispredanja. Elektroispredena nanovlakna karakteriziraju i izrazito visok omjer površine prema volumenu, čak 1000 x veći od vlasi ljudske kose (Slika 1.), podesiva poroznost, mogućnost prilagodbe širokom rasponu veličina i oblika te sposobnost kontroliranja sastava nanovlakana kako bi se postigla željena svojstva i funkcija vlakana. Sve te karakteristike elektroispredanih vlakana omogućuju im primjenu u različitim poljima, kao što je nanokataliza, tkivno inženjerstvo, zaštitna odjeća, filtracija, biomedicina, farmacija, optička elektronika, zdravstvo, biotehnologija i zaštita okoliša. U tekstilnoj industriji ova tehnika se koristi više od šezdeset godina za proizvodnju netkanih materijala. Posljednjih desetljeća sve je veće zanimanje i istraživanje ove tehnike zbog primjene nanovlaknastih struktura u tkivnom inženjerstvu. [1,2]

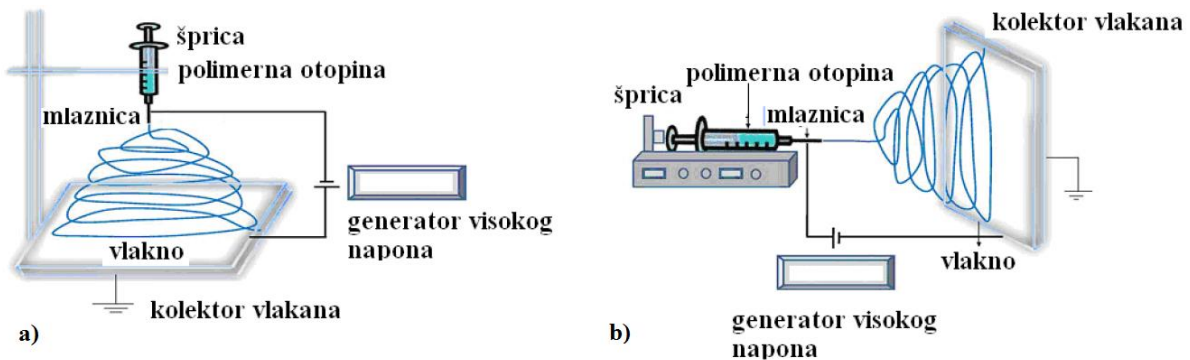


Slika 1. Usporedba promjera vlasi ljudske kose i pojedinačnih nanovlakana [3]

Princip procesa elektroispredanja sličan je onom kod elektrostatskih precipitatora i raspršivača pesticida gdje jake, međusobno odbojne električne sile prevladavaju slabije površinske sile električki nabijene polimerne otopine. Za injektiranje određenog naboja u polimernu otopinu ili talinu potrebna je istosmjerna struja, napona od nekoliko desetaka kV. Proces se provodi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku. Obzirom da neki polimeri mogu imati neugodan ili čak štetan miris ovaj je proces potrebno provoditi unutar komore s ventilacijskim sustavom. [1,2]

Standardna aparatura za proces elektroispredanja može biti horizontalna ili vertikalna i sastoji se od tri glavne komponente (Slika 2.): [1,4]

- izvor visokog napona s pozitivnim ili negativnim nabojem koji se injektira u tekućinu,
- mlaznica za pređenje, odnosno kapilara kroz koju pod utjecajem sile prolazi tekućina koja se elektroispreda,
- uzemljeni kolektor (metalni zaslon, ploča ili rotirajuća osovina).



Slika 2. Osnovni tipovi aparature za elektroispredanje: a) vertikalna i b) horizontalna [1]

Većina se polimera prije procesa elektroispredanja otapa u odgovarajućem otapalu. Kada se polimer potpuno otopi nastala polimerna otopina se uvodi u kapilaru malog promjera. Za prodiranje otopine kroz kapilaru mogu se koristiti injekcijska šprica, gravitacijske sile ili plin pod tlakom. Na taj način otopina prodire kroz kapilaru, dolazi do vrha kapilare i zbog površinske napetosti formira viseću kap na njenom vrhu. Polimerna otopina se tada podvrgava pod utjecaj električnog polja tako da se elektroda iz izvora visokog napona uroni u tekućinu ili, ako se koristi metalna igla, direktno u kontaktu s kapilarom. Potom se uključi izvor napona i naboj se injektira u polimernu otopinu. Povećanje snage električnog polja uzrokuje odbojne interakcije između istih naboja u tekućini te privlačne sile između suprotno nabijene otopine i kolektora. Zbog utjecaja vlačnih sila dolazi do izduljivanja viseće kapi na vrhu kapilare. Daljnjim povećanjem snage električnog polja postiže se točka u kojoj električne sile uravnotežuju površinsku napetost tekućine što rezultira razvojem Taylorovog konusa. Kada jakost električnog polja premaši tu kritičnu vrijednost dolazi do izbacivanja i ubrzavanja mlaza vlakana do brzine translacije oko 5 m/s iz vrha konusa prema kolektoru. U tom prostoru između vrha kapilare i kolektora javlja se nestabilnost što za posljedicu ima povećanje vremena prolaza i dužine puta prema kolektoru. To

pridonosi stanjivanju vlakana i procesu isparavanja otapala zbog čega se polimerna vlakna skrućuju. Kada polimerna vlakna stignu na kolektor tamo se nakupljaju i na površini kolektora se stvara vlaknasta podloga. Duljina vlakana ovisi o viskoznosti polimerne otopine i karakteristikama primijenjenog električnog polja. [1,4-6] Tijekom elektroispredanja postoje brojni parametri koji utječu na karakteristike nastalih vlakana. Ti parametri se mogu podijeliti na parametre otopine, procesne parametre i parametre okoline. Utjecaj različitih parametara prikazan je u tablici 1.[1]

Tablica 1. Parametri elektroispredanja (otopine, procesni i okolni) i njihov utjecaj na morfologiju vlakana [1]

Parametri		Utjecaj na morfologiju vlakana
Parametri otopine	viskoznost	pri maloj viskoznosti dolazi do proizvodnje grudica; pri velikoj viskoznosti dolazi do povećanja promjera vlakna i nestanka grudica
	koncentracija polimera	povećanjem koncentracije povećava se promjer vlakana
	molekulska masa polimera	povećanjem molekulske mase smanjuje se broj grudica i kapljica
	vodljivost	povećanjem vodljivosti smanjuje se promjer vlakana
	površinska napetost	nema značajne povezanosti s morfologijom vlakana; velika površinska napetost rezultira nestabilnošću mlaza
Procesni parametri	primijenjeni napon	povećanjem napona smanjuje se promjer vlakana
	udaljenost između vrha i kolektora	određena minimalna udaljenost potrebna za ujednačena vlakna; pri premalim i prevelikim udaljenostima dolazi do nastajanja kapljica
	brzina napajanja/ protok	smanjenjem protoka smanjuje se promjer vlakana; pri prevelikim brzinama protoka dolazi do proizvodnje grudica
Parametri okoline	vlažnost	visoka vlažnost rezultira kružnim porama na vlaknima
	temperatura	povećanjem temperature smanjuje se promjer vlakana

2.1.1. Karakterizacija elektroispredanih nanovlakana

Obzirom da se u elektroispredanju kao sirovina koriste polimeri, vrlo su bitne njihove karakteristike prije, ali osobito nakon procesa elektroispredanja. Svojstva elektroispredanih polimernih nanovlakana mogu se svrstati u tri kategorije i to: fizikalna i strukturna, mehanička te kemijska svojstva. [1]

2.1.1.1. Geometrijska karakterizacija

Fizikalna karakterizacija je povezana sa strukturom i morfologijom te unutarnjom strukturom nanovlakana koja određuje i mehanička svojstva materijala. Geometrijska svojstva nanovlakana uključuju promjer vlakana, raspodjelu promjera, orijentaciju vlakana i morfologiju vlakana. Za karakterizaciju geometrijskih svojstava koriste se tehnike kao što su pretražni elektronski mikroskop (SEM), pretražni elektronski mikroskop s emisijom polja (FESEM), transmisijski elektronski mikroskop (TEM) i mikroskop atomskih sila (AFM). SEM tehnika se koristi za istraživanje strukture elektroispređenih vlakana. TEM služi za određivanje promjera vlakana (<300 nm). AFM se koristi za određivanje interakcija atomskih sila na maloj udaljenosti (0,1 do 10 nm). Stoga je AFM najbolja tehnika za određivanje morfologije površine. Za određivanje svojstava površine elektroispređenih vlakana koriste se još i fotoelektronska spektroskopija (XPS), mjerenje kontaktnog kuta te spektroskopija Fourierovom transformacijom u infracrvenom području uz dodatak za površinsku analizu (ATR-FTIR). [1]

Važan geometrijski parametar je poroznost te veličina pora nanovlaknastih membrana zbog njihove primjene u filtraciji, tkivnom inženjerstvu, zaštitnoj odjeći itd. Poroznost se definira kao sposobnost materijala da u jednome smjeru propušta plinove, kapljevine i čvrste tvari kroz fine otvore. Kod elektroispređenih vlakana javlja se problem kada su veličine pora male jer nisu pogodne za infiltraciju stanica. [1,7]

2.1.1.2. Kemijska karakterizacija

Kemijska karakterizacija elektroispređenih nanovlakana ima izuzetno važnu ulogu u razumijevanju odnosa između strukture i svojstava tih materijala. Stoga je važno upoznati se s tehnikama kemijske karakterizacije koje se koriste za identifikaciju elektroispređenih nanovlakana. Karakterizacija molekulske strukture nanovlakana može se provesti pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i nuklearne magnetne rezonancije (NMR). Osim tih tehnika za kemijsku karakterizaciju elektroispređenih nanovlakana koriste se još: gel permeacijska kromatografija (GPC), elementarna analiza (EA), energetski disperzivna rendgenska spektroskopija (EDS) i dr. Trenutna istraživanja vezana uz polimerna (kompozitna) nanovlakna su ponajviše fokusirana na potencijalnu komercijalnu primjenjivost materijala. [1,8]

2.1.1.3. Mehanička karakterizacija


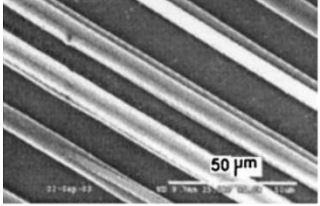
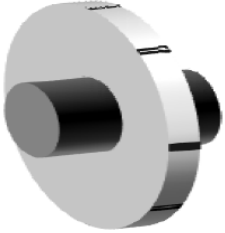
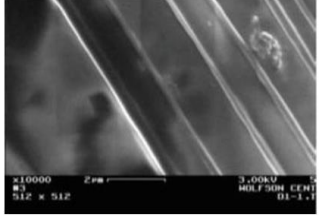
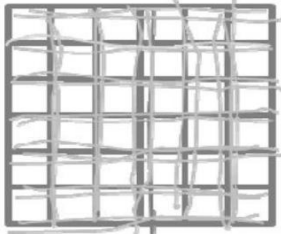
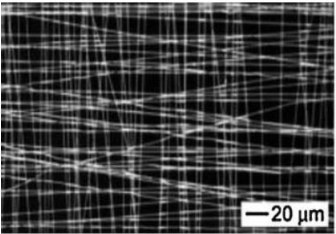
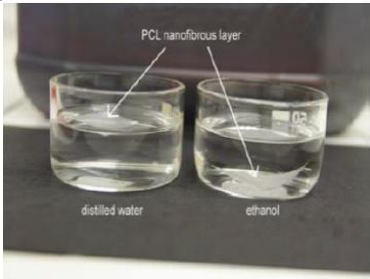
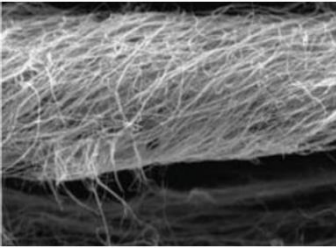
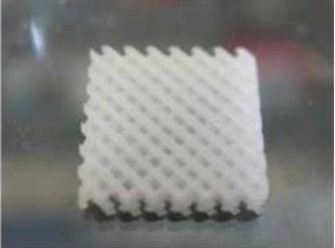
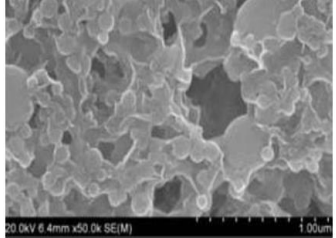
Precizno mjerenje mehaničkih svojstava nanovlakana je od ključne važnosti, osobito za biomedicinsku primjenu kao što su npr. nosači jer moraju biti u stanju izdržati sile uzrokovane rastom tkiva ili tijekom fiziološkog djelovanja te moraju biti srodnih biomehaničkih svojstava. Postoje razni pristupi koji se primjenjuju kod mehaničke karakterizacije nanovlakana uključujući: ispitivanje tvrdoće po Brinellu, testovi savijanja, mjerenje frekvencije rezonancije i ispitivanja mikro napetosti, nadalje određivanje Youngovog modula, vlačne čvrstoće, i naprezanja pri prekidu, koji se također određuju izvođenjem testova za čvrstoću nanovlakana. [1,9]

2.1.2. Vrsta kolektora

U procesu elektroispredanja važnu ulogu ima vrsta kolektora koji se primjenjuje. Uobičajeno se koristi stacionarni kolektor koji rezultira stvaranjem nasumično orijentiranih vlakana, dok se za proizvodnju jednolikih vlakana koristi rotirajući kolektor. Također, važno je da je materijal koji se koristi kao kolektor vodljiv. Nevodljivi kolektor daje vlaknaste strukture veće poroznosti. To dovodi do manje gustoće pakiranja vlakana, odnosno do smanjenja količine prikupljenih vlakana. No, ako se kao kolektor koristi vodljiv materijal, dolazi do prikupljanja zbijenih vlakana, visoke gustoće pakiranja. Pretpostavlja se da vodljivi kolektori odvede preostali naboj vlakana, dok nevodljivi kolektori nemaju tu mogućnost pa se prikupljena vlakna međusobno odbijaju, čime se smanjuje gustoća pakiranja. [4,10]

Općenito se kao kolektor koristi aluminijska folija. Međutim, zbog problema s prijenosom prikupljenih vlakana i dobivanja jednolikih vlakana, kolektori su se tijekom godina istraživanja modificirali. Tako se kao kolektori koriste i: vodljivi papir, vodljive tkanine, žičane mreže, igle, rotirajući štapovi, valjci, diskovi, tekućine koje nisu otapala kao što je metanol koagulacijska kupelj, 3D printani kolektori i sl. (Tablica 2.). [1,11]

Tablica 2. Različiti kolektori i izgled elektroispredenih vlakana [11]

Kolektor	Geometrija kolektora	SEM slika vlakana
Tanka igla od nehrđajućeg čelika s oštrim vrhom		
Rotirajući disk		
Žičana mreža		
Koagulacijska kupelj		
3D printani kolektor		

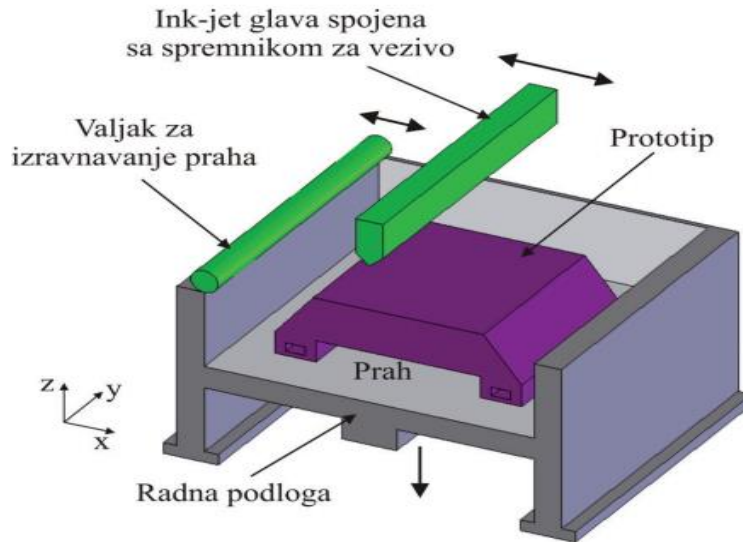
Wang i sur. istraživali su puhanjem potpomognut proces elektroispredanja hijaluronske kiseline uporabom dvije vrste kolektora, aluminijske folije i žičanog zaslona. Ustanovili su da slabije vodljiva površina žičanog zaslona negativno utječe na prikupljanje vlakana, odnosno da zbog

manje površine dolazi do proizvodnje vlakana zrnate strukture. U drugom istraživanju uspoređen je žičani zaslon s aluminijskom folijom i žičani zaslon bez aluminijske folije u istom vodljivom području. Utvrđeno je da je čisti žičani zaslon bolji kolektor za prikupljanje vlakana jer omogućuje jednostavan prijenos vlakana na druge supstrate. Raspored i orijentacija vlakana određena je vrstom i brzinom rotacije kolektora. Tako uporaba rotirajućeg diska ili metalnog okvira kao kolektora omogućuje proizvodnju paralelnih elektroispređenih vlakana. Za dobivanje paralelnih vlakana koriste se i različite vrste odvojenih elektroda koje obično kao i kolektori sadrže dva vodljiva supstrata odvojena prazninom gdje se prikupljaju vlakna. [1,12]

2.1.3. 3D tisak

Aditivna proizvodnja (engl. *Additive Manufacturing, AM*) je izraz koji obuhvaća postupke kojima je moguća izrada proizvoda relativno komplicirane geometrije na temelju računalnog 3D modela tvorevine u relativno kratkom vremenu. Prva industrijska uporaba AM postupaka zabilježena je 1987. godine. Radi se o postupku stereolitografije proizvođača 3D Systems u kojem se tanak sloj kapljevitog polimera očvršćuje UV laserom. Glavna prednost ove vrste postupaka je izrada tvorevina u jednom koraku, izravno iz modela i na način da se materijal dodaje sloj po sloj. Također, aditivni postupci ne zahtijevaju planiranje toka procesa, izradu kalupa, specifičnu opremu za rad s materijalima, transport između radnih mjesta.[13]

3D tisak samo je jedan od brojnih postupaka koji spada u grupu aditivnih postupaka. Postupak 3D tiskanja razvijen je 1989. godine u SAD-u, na MIT-u (engl. *Massachusetts Institute of Technology, MIT*) i zasniva se na nanošenju materijala primjenom ink-jet tehnologije. Međutim, u 3D tiskanju (Slika 3.) umjesto tinte izbacuje se vezivo ili ljepilo. Kako se vezivo i prah nanose u slojevima, prototip se izrađuje sloj-po-sloj. [13,14]



Slika 3.3D tisk [13]

U svim postupcima proizvodnje tvorevina pa tako i 3D tisku, faze izrade su iste i sastoje se od: izrade CAD modela, pretvaranja CAD modela u STL datoteku, prebacivanja STL datoteke na AM stroj, podešavanja parametara AM stroja, pravljenja prototipa, vađenja prototipa, naknadne obrade ako je potrebna te na kraju uporaba. [13]

Model predmeta koji se želi isprintati treba biti spremljen u STL formatu, standardnom formatu koji je podržan od strane svih programa za 3D printanje. Pisaču je potreban skup naredbi kako bi se pokrenulo printanje. Naredbe se generiraju iz 3D modela prema zadanim parametarima koji ovise o tehnologiji 3D printanja koja se koristi. Printanje se odvija sloj-po-sloj. Standardna debljina sloja je 0.1 mm, no ovisno o tehnologiji može varirati od nekoliko mikrona do nekoliko centimetara. Prvi sloj se ispisuje na podlogu radnog stola, a zatim se glava pisača podiže ili se radni stol spušta za visinu sloja i nanosi sljedeći sloj. Postupak se ponavlja dok se predmet ne isprinta. [15]

Printanje je ograničeno dostupnim materijalima za izradu predmeta. Kao materijali koriste se različiti polimerni materijali (akrilne smole, epoksidne smole, gips, pijesak, PVC, papir, silikon itd.), metali (cink, aluminij bronca, nehrđajući čelik, legure titana i dr.) te keramika. [15]

Danas postoji veliki interes za usklađivanje pristupa proizvodnje aditiva (AM) s procesom elektroispredanja. AM proizvodi složene 3D strukture sloj-po-sloj procesom pomoću računalom

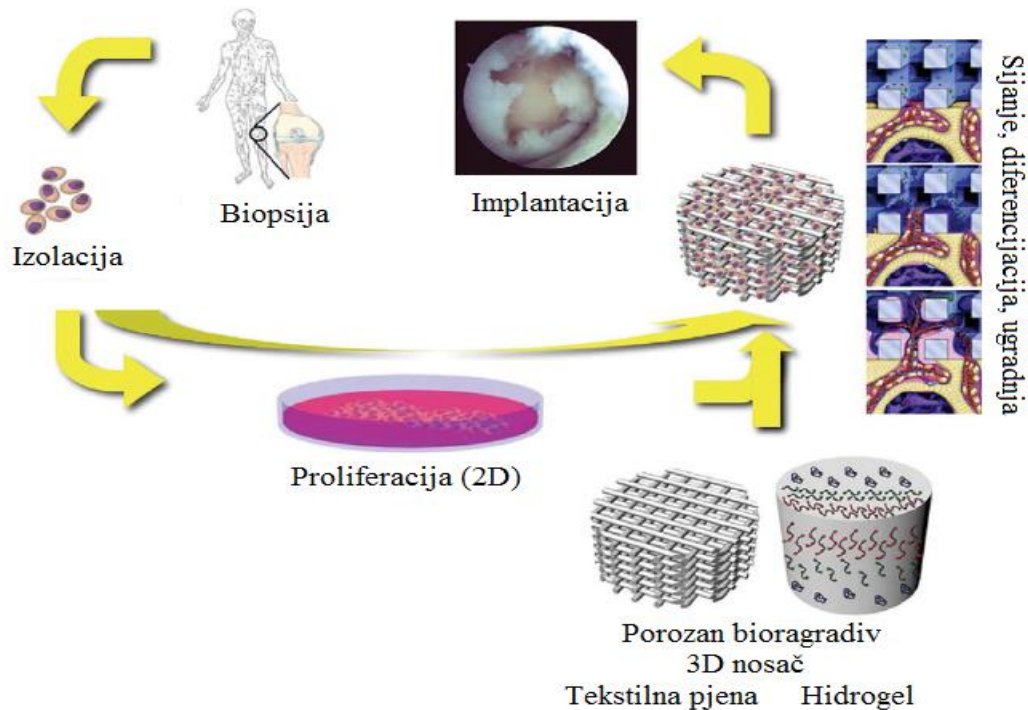
potpomognutog dizajna (CAD) i stoga ima potencijal za proizvodnju kolektorskih ploča s točno kontroliranom geometrijom za proces elektroispredanja. [16]

Kombinacija AM pristupa s elektroispredanjem za dizajniranje geometrije kolektora omogućila je proizvodnju hibridnih nosača koji se sastoje od nasumično raspoređenih vlakana i definirane 3D mikro-topografije na površini. Sustav ubrzanog prototipiranja (RP) korišten je za dizajniranje i proizvodnju tvorevina smole kao kolektora. AM pristup predstavlja precizno, svestrano i podesivo sredstvo za proizvodnju struktura s preciznom kontroliranom mikrogeometrijom. RP tvorevine mogu se proizvoditi uzimajući u obzir specifične zahtjeve korisnika te zbog toga precizno oponašaju topografiju tkiva. [16]

2.2. Tkivno inženjerstvo

Tkivno inženjerstvo je interdisciplinarno područje koje primjenjuje načela inženjerstva i prirodnih znanosti za razvoj funkcionalnih tkiva i organa pogodnih za regeneraciju, popravak i zamjenu oštećenih, bolesnih ili izgubljenih dijelova tijela. [17,18]

Strategija tkivnog inženjerstva temelji se na popravku i regeneraciji oštećenih tkiva na način da se najprije biopsijom stanice uzimaju iz pacijenta (Slika 4.). Zatim se stanice izoliraju i umnožavaju na dvodimenzionalnim podlogama za uzgoj ili se direktno zasijavaju na 3D porozni i biorazgradljivi nosač. Nosači moraju biti dizajnirani tako da omogućuju povezivanje stanica, proliferaciju, migraciju i diferencijaciju kako bi se moglo razviti novo tkivo. Potom se novoformirano tkivo, integrirano s nosačem, ugrađuje na oštećeno mjesto u ljudskom tijelu kako bi se stvorila homogena cjelina s okolnim prirodnim tkivima. [19]



Slika 4. Strategija tkivnog inženjerstva za popravak i regeneraciju oštećenog tkiva [19]

U tkivnom inženjerstvu kao nosači se koriste različiti materijali koji tijekom regeneracije tkiva i organa djeluju konduktivno. Kondukcija je sposobnost određenog materijala da omogući pričvršćivanje staničnih elemenata ili bioaktivnih molekula te omogući njihovo djelovanje tijekom regeneracije. Nosač služi samo kao privremena 3D rešetka koja zamjenjuje ulogu izvanstanične matrice (engl. *extracellular matrix*, *ECM*) dok se ne sintetizira nova ECM. On omogućuje prostorni razmještaj staničnih elemenata i njihovu aktivnost u produkciji komponenti međustanične tvari. S vremenom se nosač potpuno razgrađuje i pri tome zamjenjuje novostvorenom ECM. [18]

Nosači koji se primjenjuju u tkivnom inženjerstvu moraju ispuniti sljedeće uvjete: [17,18,20]

- biokompatibilnost

Biokompatibilnost je mjera kompatibilnosti nosača s biološkim sustavom. Stanice moraju prijanjati na nosač, normalno funkcionirati, migrirati po površini i kroz nosač te se umnožavati na materijalu. Nakon ugradnje u ljudsko tijelo, nosač ne smije izazvati imunološku reakciju kako bi

se spriječio bilo kakav upalni proces koji bi mogao smanjiti ozdravljenje ili prouzročiti odbacivanje materijala od strane tijela.

- biorazgradljivost

Biorazgradljivost nosača je važna jer oni nisu namijenjeni kao trajni umetci već privremeno ostaju u tijelu pacijenta. Zbog toga je važno da se nosači razgrađuju brzinom jednakoj brzini stvaranja novog tkiva, a nusprodukti razgradnje ne smiju biti toksični.

- mehanička svojstva

U idealnom slučaju, nosač bi trebao imati mehanička svojstva u skladu s anatomskim položajem u koji se treba ugraditi i dovoljno čvrste strukture za kirurško rukovanje tijekom same ugradnje. Osim čvrstoće, nosač mora biti i elastičan kako bi se tijekom primjene mogao oduprijeti statičkim i dinamičkim deformacijama bez oštećenja i gubitka mase. Izrada nosača odgovarajućih mehaničkih svojstava veliki je izazov u inženjerstvu kostiju i hrskavice.

- struktura

Nosači moraju imati visoko poroznu strukturu s međusobno dobro povezanim porama. Dimenzije pora moraju biti nekoliko puta veće od stanica kako bi se stanice mogle ravnomjerno rasporediti unutar samog nosača te kako bi se nesmetano mogla odvijati difuzija hranjivih tvari i otpada.

2.2.1. Umjetni i prirodni nosači za uzgoj tkiva

Biomaterijali se definiraju kao materijali namijenjeni povezivanju s biološkim sustavima u svrhu procjene, liječenja, povećanja ili zamjene bilo tkiva, organa ili funkcije tijela. U tkivnom inženjerstvu postoje dvije skupine biomaterijala koje se koriste za izradu nosača, a to su umjetni i prirodni biomaterijali. Svaka od tih skupina ima određene prednosti, ali i nedostatke pa se sve češće koriste kompozitni nosači sačinjeni od više različitih faza. [20-22]

Prirodni polimeri su bili među prvim biorazgradljivim materijalima koji su se kao nosači koristili u kliničke svrhe. Oni se dobivaju iz prirodnih izvora i obrađuju kako bi se dobili porozni nosači. Prirodni biomaterijali obično imaju izvrsnu biokompatibilnost što omogućuje jako dobre interakcije s različitim tipovima stanica te ne izazivaju imunološke reakcije. Za razliku od

umjetnih, prirodni polimeri su biološki aktivni i jako poboljšavaju staničnu adheziju i rast. Prednost prirodnih nosača je i mogućnost biorazgradnje. Na taj način omogućuju stanicama da tijekom vremena sintetiziraju ECM koja zamjenjuje razgrađeni nosač. Međutim, izrada nosača od bioloških materijala homogene i obnovljive strukture predstavlja pravi izazov. Osim toga, ograničena fizikalna i mehanička svojstva prirodnih nosača čini ih neprikladnim za određene primjene, npr. u ortopedskoj primjeni. Zbog tih nedostataka istraživači su potaknuli razvoj tehnologija za poboljšanje i jačanje mehaničkih svojstava i oblika prirodnih biomaterijala. Te tehnologije uključuju razvoj kompozita s umjetnim materijalima i umrežavanje. U tkivnom inženjerstvu se koriste prirodni materijali poput kolagena, različitih proteoglikana, podloge na bazi alginata, citozan i drugi. [20,22,23]

Umjetni biomaterijali se općenito mogu podijeliti u anorganske i organske. Smatra se da umjetni biomaterijali imaju bolje kontrolirana fizička i mehanička svojstva od prirodnih biomaterijala te se kao takvi mogu koristiti i za meka i tvrda tkiva. Među umjetnim polimerima, trenutno se kao nosači najviše primjenjuju poli(L-laktična kiselina) (PLLA), poliglikolna kiselina (PGA), polikaprolakton (PCL) i polilaktično-glikolna kiselina (PLGA). Ovi polimeri uspješno se koriste kao nosači jer se mogu proizvesti točno odgovarajuće građe, a njihova svojstva razgradnje kontroliraju se promjenom samog polimera ili sastava pojedinog polimera. Međutim, nedostatak umjetnih polimera je loša biokompatibilnost. Zbog smanjene bioaktivnosti prilikom pričvršćivanja stanica na umjetni nosač te njihova rasta može doći do izazivanja imuno reakcije ili čak toksičnosti, osobito ako se primjenjuju određene kombinacije polimera. Zbog toga su razvijeni mnogi postupci modifikacije površine i svojstava radi poboljšanja njihove biokompatibilnosti. Prilikom primjene PLLA ili PGA kao nosača, problem se javlja kod procesa razgradnje jer se ovi polimeri razgrađuju hidrolizom i pritom stvaraju ugljikov dioksid. To uzrokuje sniženje lokalne pH vrijednosti što može dovesti do nekroze stanica i tkiva. Kako bi se smanjili nepoželjni efekti vezani uz hidrofilnost, povezivanje stanica i biorazgradljivost, umjetni polimeri koriste se u kombinaciji s prirodnim polimerima. [20-22]

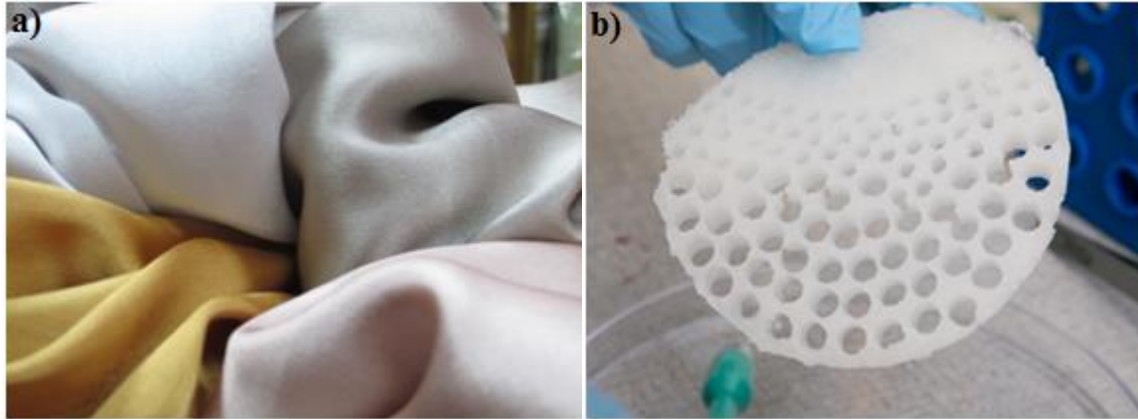
Osim ove dvije skupine postoji još jedna skupina materijala koji se koriste kao nosači, a to je keramika. Keramika je materijal načinjen od anorganskog, nemetalnog materijala koji može posjedovati kristalnu strukturu. Iako se obično ne primjenjuju za regeneraciju mekog tkiva, keramički nosači poput hidroksiapatita (HA) i trikalcij fosfata (TCP) svoju su primjenu našli u

području regeneracije kostiju. Keramičke nosače karakterizira velika mehanička krutost, jako mala elastičnost te tvrda i krta površina. Iz perspektive kostiju, oni pokazuju odličnu biokompatibilnost zbog svoje kemijske i strukturne sličnosti s mineralnom fazom prirodne kosti. Međutim, njihova primjena u tkivnom inženjerstvu je ograničena zbog lomljivosti, teškog oblikovanja za implantaciju te jer nova kost stvorena u poroznoj mreži hidroksiapatita ne može podnijeti mehaničko opterećenje potrebno za obnavljanje. [20,23]

Prirodni polimeri koji se najčešće upotrebljavaju kao nosači za uzgoj tkiva su svila, hitozan, kolagen i hijaluronska kiselina.

2.2.1.1. Svila

Svila je prirodni vlaknasti polimer koji se dobiva kada ličinke nekih kukaca, najčešće dudova svilca, pletu čahure koje su im potrebne pri transformaciji u leptire. Ubraja se među najstarija vlakna poznata ljudima, a već više od tisuću godina se koristi u tekstilnoj industriji (Slika 5.a). Sastoji se od 78% svilenog fibroina i 22% svilenog ljepila, tj. sericina. Svileni fibroin je proteinska komponenta čija su svojstva razlog brojnih istraživanja, osobito u biomedicinske svrhe. Sadrži nekoliko važnih bioloških svojstava, a to su biokompatibilnost, biorazgradljivost, minimalna upalna reakcija i izvrsna mehanička svojstva. Jedinstvena kombinacija elastičnosti i čvrstoće te kompatibilnost stanica sisavaca čine svileni fibroin pogodnim nosačem u području tkivnog inženjerstva (Slika 5. b). Za postizanje različitih svojstava kao što su određena brzina razgradnja, poroznost i dr. koriste se kompoziti. Tako se npr. kompozit hitozan i svilena fibroinska nanovlakna proizvodi elektroispredanjem i koristi za zavijanje rana. Kompozit svile i hidroksiapatita, također za zavijanje rana, dobiva se dodavanjem praškastog hidroksiapatita u svileni fibroin i potom stvaranjem želatinaste smjese. [1,21,24,25]



Slika 5. Primjena svile u različitim područjima: a) tekstilna industrija [26]; b) 3D svileni nosač u tkivnom inženjerstvu [27]

2.2.1.2. Hitozan

Hitozan je linearni biorazgradljivi polimer koji se dobiva parcijalnim deacetiliranjem hitina, koji je sastavni dio oklopa rakova i krila kukaca. Posjeduje brojna dobra svojstva kao što su biokompatibilnost, biorazgradljivost, niska toksičnost, kontrolirana mehanička i strukturna svojstva te sposobnost obrade u različite oblike i veličine koja su razlog njegove široke primjene. Topljivost hitozana ograničena je pri fiziološkom pH što je također prednost za primjenu na duži vremenski period. Zahvaljujući gelirajućim svojstvima i mogućnosti umreživanja, hitozan je pronašao veliku primjenu za izradu nosača u tkivnom inženjerstvu. Dakle, 3D nosači hitozana, sami ili u kombinaciji s drugim prirodnim polimerima se primjenjuju za popravak i/ili regeneraciju različitih tkiva, uključujući kožu, kost, hrskavicu, živce, jetru i mišiće. [1,21,28,29]

2.2.1.3. Kolagen

Postoji oko 29 poznatih vrsta kolagena koji posjeduju različite karakteristike i mogu se ekstrahirati iz gotovo svih vrsta na planeti, uključujući ljude. U ljudskom tijelu je prisutan u obliku vlakana ili gelova u ECM i kostima te služi za podupiranje tkiva. Zbog svoje široke prisutnosti u rastu i potpori organima, koristi se kao 3D nosač u tkivnom inženjerstvu i to u rasponu od kostiju do regeneracije mekih tkiva kao što su hrskavica, vaskulatura i živci. Za primjenu u tkivnom inženjerstvu istraživane su različite vrste kolagena, kao što su kolagen tipa I, II, III, IV, XI. Međutim, mnogi znanstvenici su kolagen tipa I opisali kao „zlatni standard“

zbog izazivanja blaže imunološke reakcije. Kolagenski nosači obično pokazuju relativno grubu površinu što pridonosi vlaknastoj prirodi i strukturnoj poroznosti uzorka. [21]

2.2.1.4. Hijaluronska kiselina

Hijaluronska kiselina (HA) je linearni polisaharid, sastavljen od ponavljajućih jedinica koje sadrže glukuronsku kiselinu i N-acetilni glukozamin. Glavna je komponenta ECM vezivnog tkiva. Posjeduje jako važne biološke funkcije i najprimjenjiviji je prirodni polimer na bazi ugljikohidrata u tkivnom inženjerstvu. Smatra se da HA djeluje kao molekularni filtar, amortizer i potporna struktura vlaknima kolagena. Osim toga, zbog svojstava biokompatibilnosti i biorazgradljivosti, široko se primjenjuje u biomedicinskom području, npr. previjanje rana, nosači u tkivnom inženjerstvu, liječenje artritisa, sastavni dio implantata i drugi. Često se HA u području tkivnog inženjerstva primjenjuje u obliku hidrogel materijala. Razlog tome je sposobnost bubrenja i ugrađivanja stanica i drugih materijala u sustavima dostave lijekova. U počecima istraživanja tehnikom elektroispredanja bilo je teško formirati jednoliku veličinu HA vlakana zbog velike viskoznosti, površinske napetosti i velike sposobnosti hijaluronske otopine da zadržava vodu. Međutim danas se HA nanovlakna uspješno proizvode zahvaljujući uvođenju dva nova parametra, brzine i temperature puhanja zraka. [1,21]

Od umjetnih polimera u tkivnom inženjerstvu veliku primjenu imaju polikaprolakton, poli (L-laktična kiselina) i polilaktično-glikolna kiselina.

2.2.1.5. Polikaprolakton

Polikaprolakton (PCL) je napoznatiji poliester koji ima široku primjenu u izradi 3D nosača za tkivno inženjerstvo. PCL je elastične prirode i sastoji se od nepolarnih metilenskih skupina i jedne semi-polarne esterske skupine. Koristi se u različitim oblicima, kao što su filmovi i vlakna. Kako bi se poboljšala bioaktivna svojstva PCL u području tkivnog inženjerstva, koriste se kompoziti PCL s drugim polimerima, kao što su želatina i hitozan. PCL se također koristi i u različite svrhe u sustavima dostave lijekova. Karakteriziraju ga prednosti koje uključuju vrlo visoku propusnost lijeka, relativno spor stupanj razgradnje i manje kiseli nusprodukti u usporedbi s drugim poliesterima. Dokazano je da je PCL jako topljiv i da ima sposobnost

miješanja s drugim biomaterijalima. Međutim, nedostatak je relativno spor stupanj razgradnje (2-4 godine) zbog čega nije idealan nosač za lijekove za kraće periode. Nadalje, PCL karakterizira slaba adhezija stanica. Kako bi se premostili ovi nedostaci i poboljšala bioaktivnost PCL, došlo je do razvoja brojnih pristupa, uključujući kopolimerizaciju, površinsku funkcionalizaciju te različite mješavine. [21]

2.2.1.6. Poli (L-laktična kiselina)

Poli (L-laktična kiselina) (PLLA) je umjetni biorazgradljivi poliestar koji nastaje polimerizacijom L-laktida iz obnovljivih izvora, kao što je kukuruz, pšenica, krumpir. Učestalo se koristi za izradu nosača u području tkivnog inženjerstva i to za koštanu, hrskavičnu, tetivnu, neuralnu te vaskularnu regeneraciju. Prilikom razgradnje PLLA najčešće nastaju netoksični produkti. Posjeduje veći stupanj razgradnje u usporedbi s ukupnom razgradnjom PCL, ali se još uvijek smatra relativno sporim u usporedbi s drugim polimernim biomaterijalima koji se koriste kao nosači u tkivnom inženjerstvu. Nadalje, PLLA ima visok stupanj kristalnosti u svojim razgradbenim fragmentima, što može dovesti do upale u tijelu. Stoga se ponekad miješa s drugim polimerima za stvaranje 3D nosača. Kako bi riješili taj problem znanstvenici Fukushima i Kimura su pokazali da se PLLA može proizvesti kombinacijom L-laktične kiseline i D,L-laktične kiseline jer se D,L-laktična kiselina razgrađuje još brže i nema toliku kristalnost koja uzrokuje upalu. [21,30]

2.2.1.7. Polilaktično-glikolna kiselina

Polilaktično-glikolna kiselina (PLGA) je kombinacija poliesterskih polimera PLLA i poliglikolne kiseline (PGA) i spada u najčešće korištene biorazgradljive umjetne polimere u tkivnom inženjerstvu. Što je veći udio PGA unutar PLGA nosača, to se očekuje da će se PLGA brže razgraditi. Kao nusprodukti razgradnje nastaju mliječna kiselina i glikolna kiselina koje nisu toksične. PLGA karakterizira biorazgradivost, prilagodljivost različitim oblicima te mogućnost površinske modifikacije za primjenu u sustavima isporuke lijekova. Međutim, glavni nedostatak PLGA je njegova bioaktivnost. Iako nisu toksični, nusprodukti razgradnje PLGA su jako kiseli i ako se nalaze u velikim količinama u ljudskom tijelu, može biti vrlo teško brzo ih metabolizirati. To osobito predstavlja problem u isporuci lijekova u prisutnosti lijekova osjetljivih na kiseline.

Neki znanstvenici su istraživali metode smanjenja negativnih utjecaja razgradnje PLGA. Jedna tradicionalno popularna metoda je promijeniti omjer PGA/PLLA tako da sadrži veću količinu PGA. To rezultira bržim stupnjem razgradnje, odnosno nastaje manje kiselih nusprodukata odjednom. Međutim, nedavno je pokazano da se u prisutnosti pojedinih soli pH vrijednost PLGA nusprodukata povećava što dovodi do ukupno veće bioaktivnosti, osobito u pogledu isporuke lijekova. PLGA se koristi za proizvodnju nanočestica, mikročestica, 3D nosača za sustave isporuke lijekova i primjene u tkivnom inženjerstvu. [21]

2.3. Elektroispredeni nanovlaknasti nosači za uzgoj tkiva

Elektroispredanje predstavlja važan proces u području tkivnog inženjerstva jer omogućuje proizvodnju različitih 3D vlaknastih nosača različitih mehaničkih svojstava, stupnja razgradnje te stanične adhezije. Elektroispredene nosače čine tanka, kontinuirana polimerna vlakna, promjera veličine od 10 nm do 10 μ m. Morfološka struktura elektroispredenih vlakana slična je strukturi prirodnih ECM vlakana, jako su porozni i imaju veliki omjer površine prema volumenu što omogućuje dobro prijanjanje stanica i njihove interakcije. Zbog nasumičnog slaganja tankih vlakana u gusto zbijene mreže, elektroispredanje rezultira nosačima koji imaju izrazito finu strukturu pora, ali vrlo malih promjera što ograničava infiltraciju stanica u nosače. Kako bi se to izbjeglo mijenjanjem odgovarajućih parametara moguće je regulirati promjer pora i orijentaciju, ovisno o primjeni. [21,31,32]

2.4. Poroznost i važnost poroznosti elektroispredenih nosača u tkivnom inženjerstvu

Jedno od glavnih svojstava nosača za tkivno inženjerstvo, osobito za vaskularizaciju i prodor stanica u pore je poroznost. Brojna istraživanja pokazala su da stanični rast i vezivanje uvelike ovisi o veličini i gustoći pora unutar nosača. Poroznost je važna jer se stanične mreže oslanjaju na međusobno povezane kanale za transport hranjivih tvari, staničnu signalizaciju i proliferaciju, oponašajući prirodnu okolinu ECM u strukturi. Međutim, poroznost i omjer površine prema volumenu nosača ne bi smjeli biti tako veliki da slabe njegovu mehaničku čvrstoću. Zbog toga se 3D nosači za primjenu u tkivnom inženjerstvu suočavaju sa dva ograničenja. Prvo ograničenje karakterizira prevelika poroznost koja rezultira negativnim utjecajem na mehaničku čvrstoću, dok se drugo pak ograničenje odnosi na premalu poroznost nosača što sprječava prodor stanica,

vaskularizaciju i signalizaciju. Ovaj problem prikazan je na slici 6. gdje je vidljivo da je veća stanična infiltracija povezana s većom poroznosti, ali i da je poroznost obrnuto proporcionalna mehaničkoj čvrstoći određenog nosača. To je jedan od glavnih elemenata koje treba uzeti u obzir prilikom izrade nosača. [21]



Slika 6. Utjecaj poroznosti na svojstva nosača [21]

Znanstvenici Eichorn i Sampson pokazali su da postoji izravna korelacija između srednje vrijednosti radijusa pora elektroispredene matrice i promjera njihovih vlakana. Veći promjeri vlakana rezultiraju većim veličinama pora i obrnuto. Npr. vlakno promjera 200 nm bi rezultiralo radijusom pora od samo oko 20 nm što nije dovoljno za prodiranje stanica. Veličinu pora moguće je kontrolirati reguliranjem srednjeg promjera vlakna pomoću različitih parametara procesa elektroispredanja, kao što su viskoznost otopine, brzina rotacije cilindra za sakupljanje vlakana, napona i udaljenosti između šprice i kolektora. [31]

Druga skupina istraživača je predložila izradu elektroispredanih vlakana i od umjetnih i od prirodnih polimera. Iako su uspješno povećali staničnu adheziju, infiltracija stanica je i dalje bila ograničena. [31]

Neki istraživači predložili su uporabu odgovarajućih sredstava za povećanje poroznosti u nosačima. Zhang i sur. su istraživali povećanje pora nosača tako da su elektroispredali mješavinu PCL i želatine bez njihovog umreživanja. Potom su nosač uranjali u vodeni medij kako bi uklonili želatinu što je dovelo do nastajanja praznina, odnosno poroznog nosača. [31]

Nam i sur. su za povećanje poroznosti koristili metodu koja uključuje kristale soli. Struktura pora, poroznost i veličina pora mogu se lako kontrolirati reguliranjem količine i veličine kristala

soli. Oni su u svom istraživanju hvatali kristale soli između PCL vlakana i na taj način povećavali poroznost nosača. [31,33]

Ova i još brojna druga istraživanja pokazala su da ukupna veličina pora u nosačima, a time infiltracija stanica raste s povećanjem količine poroznih sredstava. Međutim, to je također dovelo i do ugrožavanja strukturnog integriteta nosača. [31]

Cooper-White i Vaquette predložili su uporabu kolektora sa uzorkom za povećanje veličine pora, odnosno stanične infiltracije elektroispredene nosača. Nastale elektroispredene vlaknaste podloge točno su oponašale uzorke kolektora. Ovom metodom moguće je deseterostruko povećanje veličine pora u područjima niže gustoće vlakana, što rezultira migracijom fibroblasta do 250 μm u nosač. Međutim kao i kod ranijih istraživanja, dolazi do smanjenja strukturnog integriteta nosača s nepravilnim i nehomogenim porama. [31]

2.4.1. Metode određivanja

Za mjerenje poroznosti i veličina pora nosača koriste se različiti uređaji i računalni programi. Ukupna poroznost odnosi se na količinu prostora koji zauzimaju pore prisutne u nosačima. Neka fizikalna svojstva, kao što su gustoća materijala ili nasipna gustoća nosača, mogu se koristiti za izračunavanje poroznosti nosača. Osim uporabe metode fizikalne karakterizacije, za mjerenje poroznosti mogu se koristiti i tehnike snimanja.[34]

2.4.1.1. Gravimetrijska metoda

Ukupna poroznost (π) nosača može se odrediti gravimetrijskom metodom koristeći nasipnu gustoću materijala i stvarnu gustoću materijala prema jednadžbama:

$$\rho = \frac{\textit{masa}}{\textit{volumen}} \quad (1)$$

$$\textit{ukupna poroznost, } \pi = 1 - \frac{\rho_{\textit{nosača}}}{\rho_{\textit{materijala}}} \quad (2)$$

gdje je: $\rho_{\textit{nosača}}$ - prividna gustoća nosača

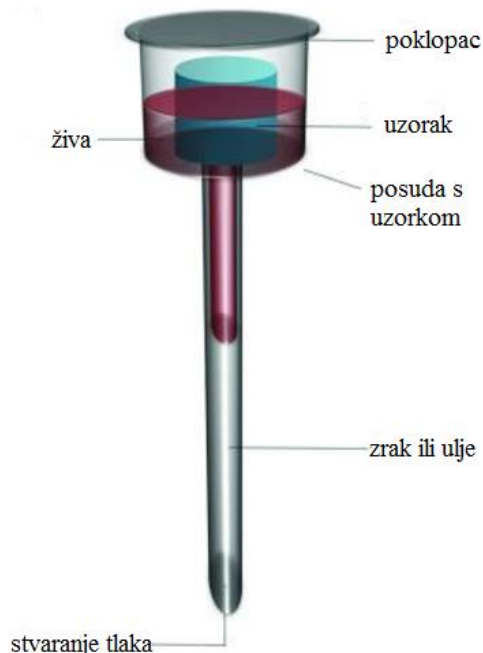
$\rho_{\textit{materijala}}$ - gustoća materijala.

Volumen je izračunat mjerenjem duljine, širine i visine uzorka. [34]

Iako je metoda brza i jednostavna, to je gruba procjena stvarne poroznosti. Značajne pogreške mogu nastati određivanjem stvarnog volumena nosača. Međutim, ova metoda je poželjna za materijale koji ne mogu izdržati visoke tlakove koji se koriste u drugim metodama određivanja poroznosti. [34]

2.4.1.2. Živin porozimetar

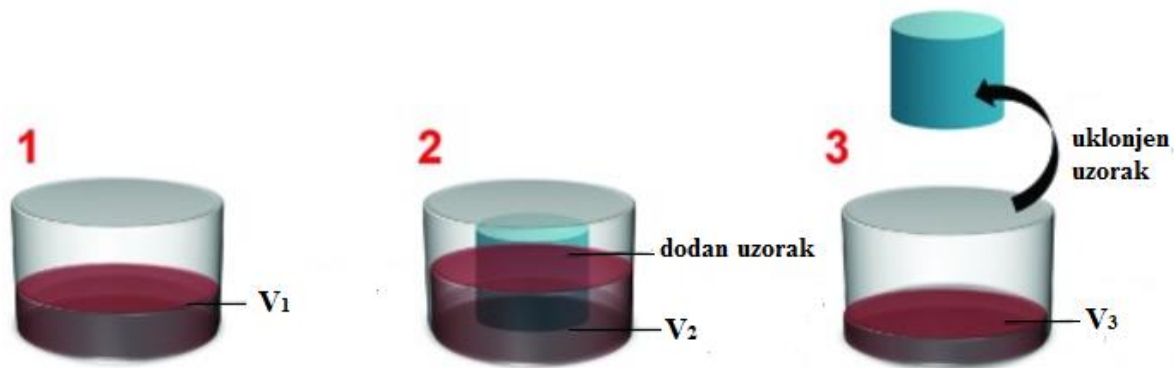
Ova metoda omogućuje određivanje ukupnog volumena pora, prosječnog promjera pora i raspodjele veličine pora 3D materijala. Nosači se postave na živin penetrometar i zatim se ulijeva živa pri povećanim tlakovima, maksimalno do 414 MPa (Slika 7.). Pod utjecajem sile pri visokim tlakovima živa ulazi u pore nosača. Budući da živa ne vlaži, dolazi samo do ispunjavanja pora kada je primijenjeni tlak veći od površinskih sila meniskusa. Tako će pore koje su manje imati veće sile zatezanja zbog veće zakrivljenosti površinskog meniskusa i zahtijevaju veći tlak za ispunjavanje volumena pora živom. Ova tehnika se koristi za analizu karakteristika pora različitih tipova nosača, kao što su HA nosači, elektroispređeni poli (ϵ -kaprolakton), nano-ili mikrovlaknasti nosači i drugi. Iako je prodor žive pouzdaniji od drugih metoda koje zahtijevaju ručno mjerenje, postoji nekoliko nedostataka vezano uz primjenu visokih tlakova. Tako bi se za biomaterijale koji se lako komprimiraju ili raspadaju trebali koristiti niži tlakovi, npr. za hidrogelove. Osim toga, materijali s tankim poprečnim presjecima se mogu također uništiti ako se analiziraju pri visokim tlakovima. Drugi nedostatak ove metode je toksičnost i cijena žive. [34]



Slika 7. Živin penetrometar [34]

2.4.1.3. Metoda pomaka tekućine

Poroznost nosača se može mjeriti i primjenom metode pomaka tekućine. Tekućina koja se koristi ne smije biti otapalo za polimere i mora lako prodrijeti u pore, a da pri tom ne uzrokuje skupljanje ili širenje veličine materijala koji se testira. Ukratko, nosač se stavi u cilindar s poznatim volumenom tekućine za pomicanje (V_1) i provodi se niz ciklusa pražnjenja i ponovnog stlačivanja kako bi se tekućina propustila kroz pore (Slika 8.). Nakon toga se izmjeri volumen (V_2), ukloni uzorak, odnosno nosač iz tekućine te ponovo izmjeri volumen preostale tekućine (V_3). Ova metoda je jednostavna i lako se provodi, ali je neizravan način mjerenja poroznosti. [34]



Slika 8.Metoda pomaka tekućine u tri koraka [34]

Otvorena poroznost može se izračunati prema jednadžbi 3.: [34]

$$poroznost = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \quad (3)$$

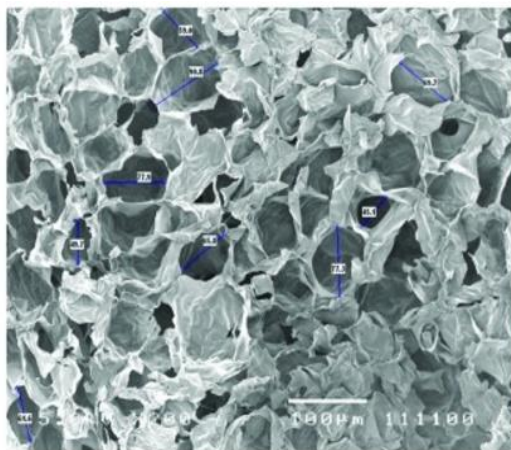
gdje je: V_1 - poznati volumen tekućine koji se koristi za uranjanje nosača,

V_2 - volumen tekućine i tekućinom impregniranog nosača,

V_3 – preostali volumen tekućine kada se ukloni tekućinom impregnirani nosač.

2.4.1.4. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

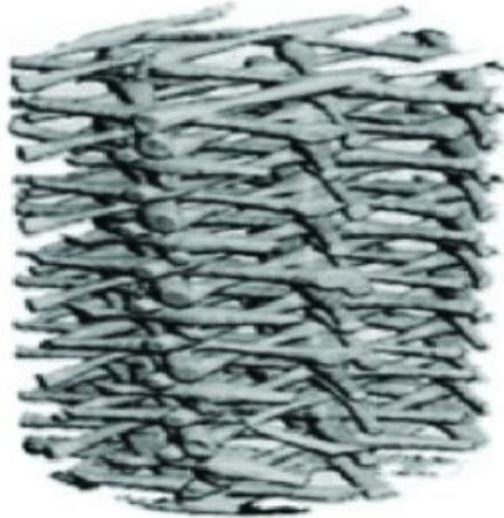
Različiti računalni programi, kao što je SemAfore ili ImageJ se mogu koristiti za analizu SEM slika za mjerenje veličina pora i poroznosti. Iz SEM slika (Slika 9.) mogu se procijeniti i područje poprečnog presjeka, međusobno povezivanje i debljina stijenke. Međutim, za dobivanje preciznih mjerenja potrebno je pažljivo provesti odjeljivanje kako bi se izbjegla kompresija poprečno odijeljenih nosača. Ova tehnika omogućuje brzo mjerenje poroznosti iz tankog presjeka slika. [34]



Slika 9. SEM tehnika snimanja [34]

2.4.1.5. Mikroročunalna tomografija slikanja

Mikroročunalna tomografija (Mikro-CT) slikanja može se koristiti za dobivanje preciznih informacija o 3D morfologiji nosača (Slika 10.). Tijekom procesa snimanja, X-zrake se koriste za podjelu nosača u serije 2D tankih presjeka. Nastale X-zrake se hvataju pomoću detektora polja koji izračunava rendgenski put i koeficijente prigušenja. Koeficijent prigušenja je u korelaciji s gustoćom materijala i na taj način se dobije 2D mapa koja pokazuje različite faze materijala unutar nosača. Nakon toga, 3D modelirajući programi, npr. Velocity, Anatomics i Mimics se koriste za stvaranje 3D modela iz prethodno dobivenih pojedinačnih 2D mapa. Obradu slika bi trebalo izvršiti prije 3D modeliranja jer bi inače moglo utjecati na naknadnu analizu. Ova metoda je neinvazivna i ne zahtijeva nikakvo fizičko odjeljivanje, što omogućuje ponovnu uporabu nosača nakon snimanja za druge analize. Osim toga, ne koriste se nikakve toksične kemikalije. Mikro-CT je također prikladan za nosače sa složenom unutrašnjom strukturom. Za složenije strukture koristi se veća rezolucija, ali je potrebno i dulje vrijeme i više prostora za pohranu podataka. Međutim, ova tehnika nije prikladna za nosače koji sadrže metale jer njihovo prigušenje znatno smanjuje X-zrake, što rezultira svijetlim i tamnim zrnastim slikama i dovodi do gubitka važnih detalja. [34]



Slika 10. Mikroračunalna tomografija slikanja za određivanje poroznosti ili veličine pora nosača [34]

2.4.1.6. CAD modeli

CAD modeli mogu se koristiti za izradu 3D nosača određenih struktura, veličina pora i poroznosti. To je jedna od najčešće korištenih tehnologija sa aspekta računalno potpomognutog tkivnog inženjerstva gdje je omogućena 3D vizualizacija i simulacija za proizvodnju 3D složenih modela tkiva. Brze tehnike za izradu prototipova kao što su 3D printanje, stereolitografija i tehnika modeliranja taloženjem, koriste CAD modele za reprodukciju vrlo preciznih struktura ili replika bioloških tkiva. [34]

Za CAD modele, poroznost se računa prema jednadžbi 4.: [34]

$$poroznost = 1 - \frac{V_{krutina}}{V_{ukupni}} \times 100\% \quad (4)$$

gdje je: $V_{krutina}$ - volumen krutine,

V_{ukupni} - ukupni volumen nosača.

2.4.1.7. Metoda na temelju permeabilnosti

Permeabilnost nosača se koristi za određivanje veličine pora i promjera vlakana elektroispredjenih fibrinogenih nosača. Carr i sur. su koristili mjerač protoka za prolaz tekućine kroz elektroispredjeni nosač kako bi izračunali svojstva pora nosača. Određuje se količina tekućine koja prolazi kroz nosač tijekom vremena. Uporabom ovog mjerača koji su dizajnirali Sell i sur., permeabilnost (T) se može izračunati na temelju jednadžbi 5. i 6.: [34]

$$p = \rho g h \quad (5)$$

$$T = \frac{Q \eta h_s}{F t p} \quad (6)$$

gdje je: p - primijenjeni tlak na vrhu (Pa),

ρ – gustoća vode,

g – gravitacijsko ubrzanje,

h – ukupna visina sustava,

Q – volumen tekućine koji prolazi kroz nosač tijekom vremena (t),

η – viskoznost tekućine,

h_s – debljina nosača,

F – poprečni presjek nosača okomit na protok tekućine.

Nakon što se izračuna permeabilnost nosača može se izračunati i radijus pora (r) prema jednadžbi 7.: [34]

$$r = \frac{0,5093}{T^{-\frac{1}{2}}} \quad (7)$$

2.4.1.8. Kapilarna porometrija

Ova nedestruktivna metoda može se koristiti za mjerenje veličine i raspodjele pora nosača. Koristi se inertni plin koji prolazi kroz nosač. Može se primjenjivati na suhom ili mokrom nosaču koji je hidratiziran uporabom tekućine poznate površinske napetosti. Računa se promjena brzine toka korištenjem razlike tlaka za suhi i za vlažni proces. Metoda koristi nizak tlak i prikladna je za mjerenje poroznih struktura nanovlaknastih membrana. Veličina pora (D) može se izračunati pomoću programa uporabom jednadžbe 8.: [34]

$$D = \frac{4Y\cos\theta}{\Delta p} \quad (8)$$

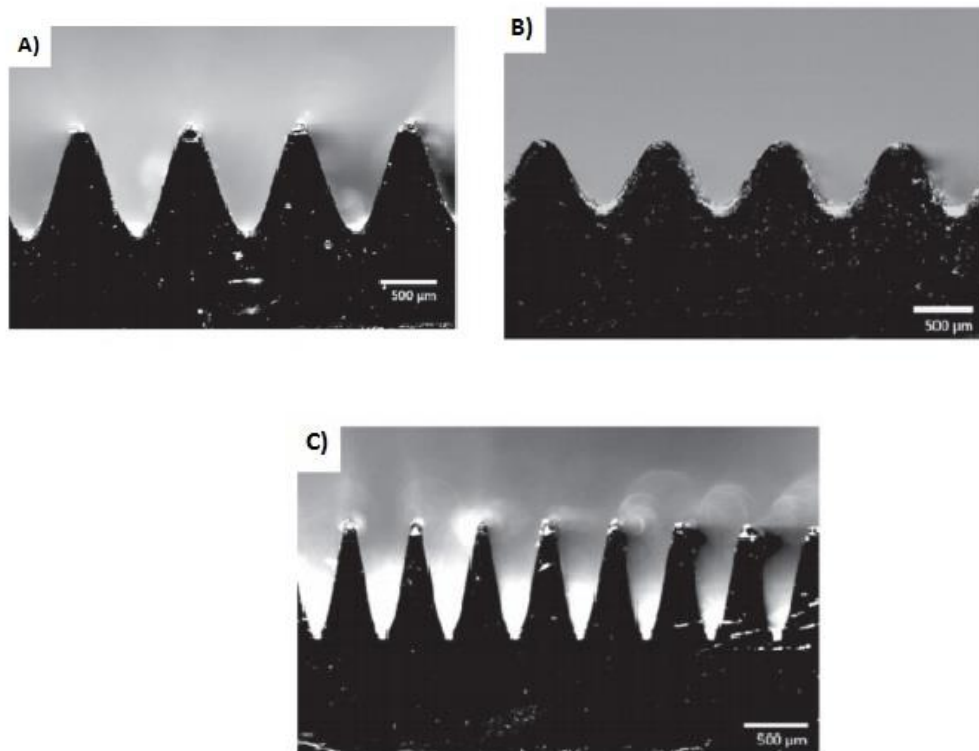
gdje je: Y - površinska napetost tekućine,

θ – kontaktni kut tekućine,

Δp – razlika tlaka.

2.4.2. Važnost poroznosti kod izrade nosača za uzgoj tkiva

Pokazalo se da korištenje 3D nosača s točno određenim geometrijskim rasporedom vlakana utječe na ponašanje stanica i može se koristiti za uzgoj stanica specifične 3D mikro-topografske ili *in vivo* strukture. Tako su pripremljeni nosači sa specifičnom topografijom, tj. u obliku sinusoidnih valova (Slika 11.), privukli zasijane fibroblastne stanice da rastu i migriraju prema obliku površine nosača, tj. da stvaraju tkivo s navedenom 3D mikrogeometrijom. Cilj je bio oponašati 3D strukturu tkiva kože (npr. dermalne papile) i vidjeti utjecaj te strukture na adheziju stanica sisavaca, a sve u svrhu istraživanja bolesti, potencijalne toksičnosti nosača i potencijalnog razvitka terapija. [16]



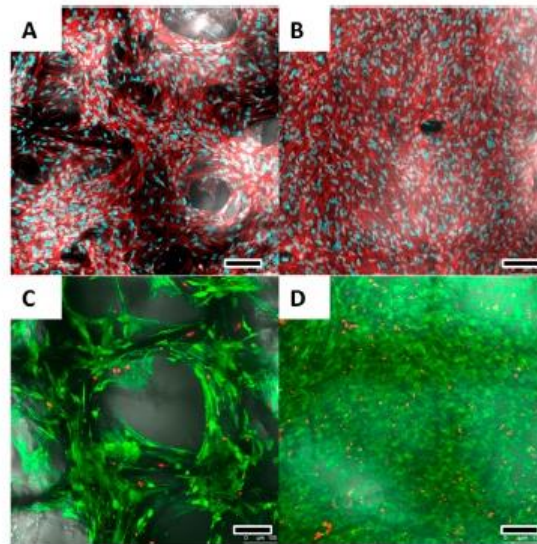
Slika 11. Nosači A), B) i C) u obliku različitih sinusoidnih valova [16]

Biokompatibilni 3D nosači mikro strukture, odgovarajućih veličina pora i promjera vlakna proizvedeni su elektroispredanjem polikaprolaktona (PCL) iz taline pomoću metalnog kolektora ciljano izrađene geometrije. Primjenom pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM) i konfokalnog laserskog mikroskopa istražena je vijabilnost i morfologija zasijanih osteoblastnih stanica, njihov rast, proliferacija i analiza kalcija *in vitro* za procjenu biokompatibilnosti PLC nosača tj. njegove prikladnosti za primjenu kod regeneriranja koštanog tkiva.

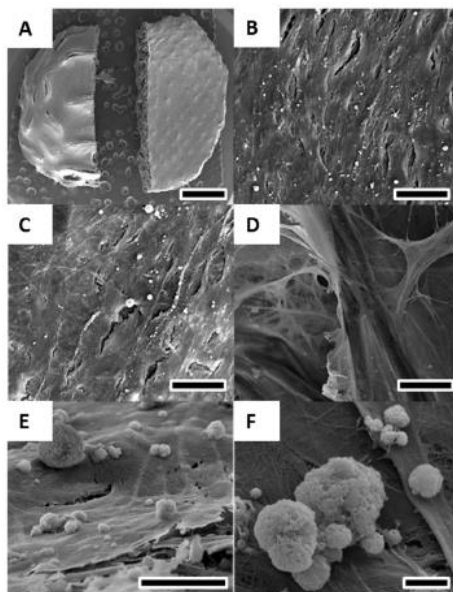
Dobiveni rezultati pokazali su da je otprilike jedna trećina stanica ostvarila adheziju na nosač nakon jednog dana. Osteoblasti su proliferirani punih 40 dana. Nakon 40 dana, nosač je bio popunjen znatno većim brojem stanica nego nultog dana ($p < 0,05$). Ponašanje stanica nakon 20 i nakon 40 dana prikazano je na slikama 12. i 13. [35]

Obojeni aktin/nuklein pokazuje izduženu i vretenastu morfologiju osteoblasta (Slika 12 A,B). Nakon 20 dana, rast stanica oponaša (ili slijedi) poziciju vlakana u nosaču, dok pore još nisu u potpunosti popunjene (Slika 12. A,C). Ipak nakon 40 dana površina nosača je u potpunosti bila pokrivena osteoblastima (Slika 12. B,D).

SEM slike (Slika 13.), kao i slike s konfokalnom laserskom mikroskopijom pokazuju vretenastu i izduženu morfologiju stanica osteoblasta kojima je nosač u potpunosti bio prekriven. Stanice osteoblasta pokazuju mineralizirani ECM, a veličina detektiranog kalcija varira između 0,5 i 15 μm . Nema razlike u rastu stanica na konkavnom nosaču s većim porama i konveksnom nosaču s manjim porama. Obojani aktin/nuklein ukazuje na infiltraciju stanica i depoziciju ECM u unutrašnjost nosača. [35]



Slika 12. Slike dobivene konfokalnim laserskim mikroskopom nakon 20 (A) i nakon 40 dana (B), obojani aktin/nuklein otkrivaju izduženu i vretenastu morfologiju osteoblasta. Nuklein je plavi, dok je aktin crven; nakon 20 dana (A,C), rast stanica oponaša (ili slijedi) poziciju vlakana u nosaču, ali pore još nisu u potpunosti popunjene stanicama nakon 20 (C) i 40 (D) dana, obojane žive/mrtve stanice otkrivaju staničnu vijabilnost $>90\%$. Žive stanice obojane su zeleno, dok su mrtve stanice crvene. Veličina skale na slikama: $10\mu\text{m}$ (A-D). [35]



Slika 13. SEM prikaz osteoblasta 40 dana nakon zasijavanja na nosaču (A) pokazuje kruti sloj osteoblasta koji pokriva cijeli nosač na konveksnoj (B) i konkavnoj (C) strani; (D) detekcija stanica i depozicija kalcija u unutrašnjosti nosača pokazuje infiltraciju stanica u pore na strukturi nosača; (E,F) depozicija kalcija od samih stanica.

Veličina skale na slikama: 2 mm(A); 25 μ m (B-D); 10 μ m (E); i 2 μ m (F).

Stanična vijabilnost pokazana je pomoću FDA/PI obojanih mrtvih/živih stanica nakon 20 i nakon 40 dana, a pokazuje >90% živućih stanica (Slika 12. C,D). [35]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U radu je korišten polikaprolakton (PCL) $M_n=80,000$, a kao otapala koristila su se: glacijalna octena kiselina i aceton, proizvođača Sigma Aldrich.

3.2. Priprema polimernih otopina

Pripremljena je 10%-tna otopina PCL-a gdje je omjer glacijalne octene kiseline i acetona iznosio 8:2, uz zagrijavanje na temperaturi od 50 °C i homogenizaciju na magnetskoj miješalici (Slika 14).



Slika 14. Polimerna otopina PCL-a na magnetskoj miješalici

3.3. Izrada kolektora pomoću 3D printera

Kolektori su prvo dizajnirani 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 nacrtava 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 15).



Slika 15. Form 2 3D printer proizvođača FormLabs

3.3.1. Opis kolektora

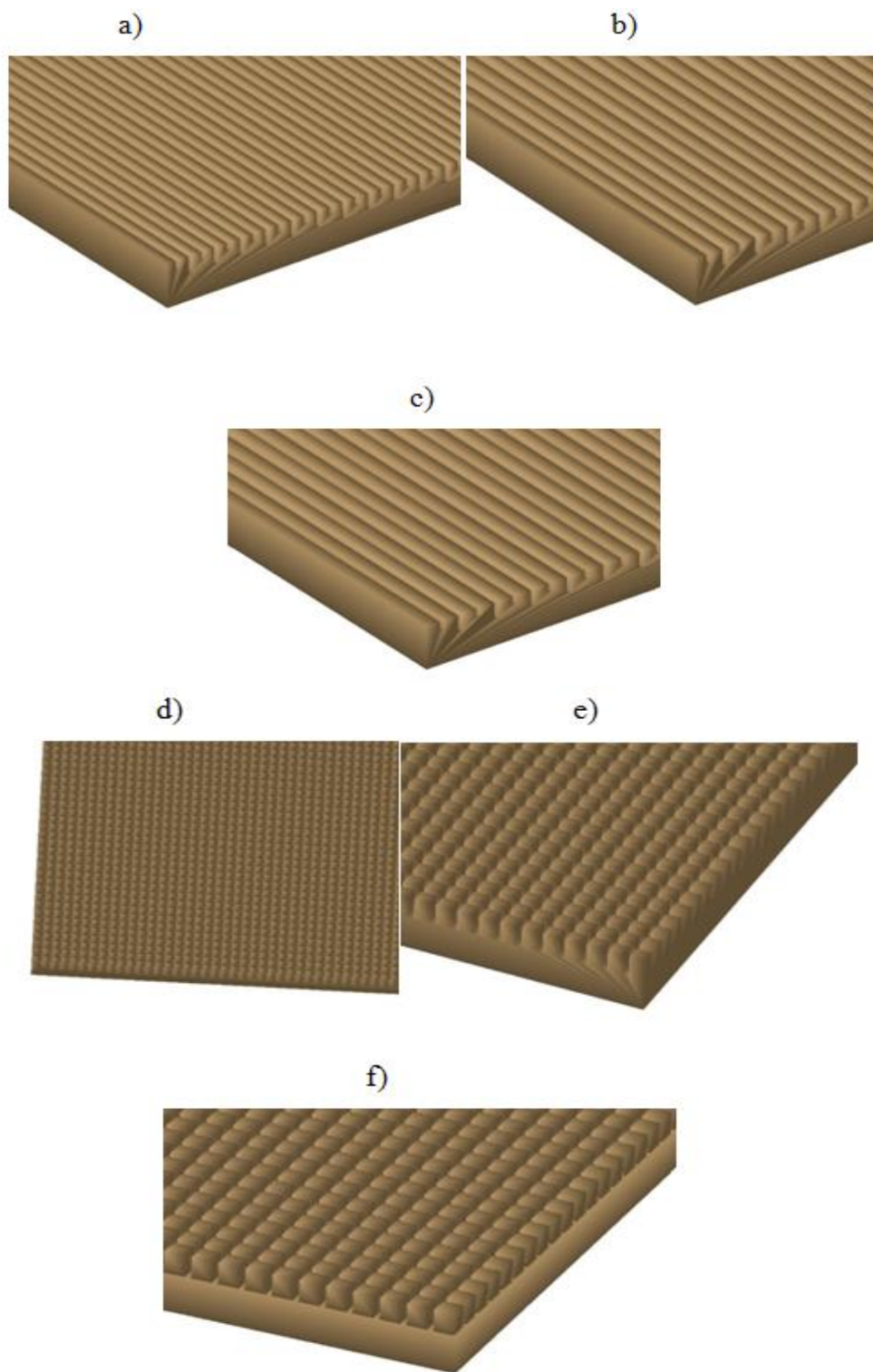
U radu je korišteno šest kolektora (nosača na kojima je vršeno elektroispredanje vlaknastog mata) koji su dobiveni postupkom 3D printanja na Form 2 3D printeru.

Primjer modela kolektora sa specifičnom topografijom paralelni kanalići (kolektori 1-3) i kvadratne udubine (kolektori 4-6) prikazan je na slici 16. a-f. Ova specifična topografija potrebna je kako bi zasijane fibroblastne stanice rasle i migrirale prema obliku površine nosača.

Kolektori 1, 2 i 3 slični su po tome što su kolektori (puni dio) različite visine tj. visine variraju 0.6 mm i 1.2 mm, a širine 0.3 mm, dok su utori (kanali) na istoj razini. Razlika između kolektora 1, 2 i 3 je u širini kanala, kod kolektora 1 širina kanala je 0.6 mm, kod kolektora 2 je 0.8 mm a kod kolektora 3 je 1 mm.

Kod kolektora 4, 5 i 6 kanali su širine (kolektor 4 je širine 0.6 mm, kolektor 5 je širine 0.8 mm, a kolektor 6 je 1 mm) dok puni dio kolektora ima jednaku širinu od 0.3 mm.

Svi modeli su s ponavljajućim utorima i kanalima na cijeloj površini širine 10 cm.



Slika 16. Modeli kolektora a) kolektor 1 , b) kolektor 2, c) kolektor 3, d) kolektor 4, e) kolektor 5 i f) kolektor 6

3.4. Postupak elektroispredanja

Elektroispredanje pripremljenih otopina PCL-a provedeno je na uređaju za elektroispredanje, NT-ESS-300, NTSEE Co. Ltd. South Korea. Uređaj za elektroispredanje sastoji se od: 1) pumpa i šprica sa iglom ravnog vrha, 2) izvor visokog napona, te 3) rotirajući cilindar, tj. kolektor, Slika 17.

Uvjeti postupka elektroispredanja su:

- električni napon: 16 kV
- udaljenost od vrha igle do kolektora vlakana: 18 cm
- brzina protoka polimerne otopine: 1 mL/h
- ukupno vrijeme (t): 4 sata

Šprica proizvođača, BD plastic, puni se sa po 4 mL otopine PCL-a. Šprica s iglom stavlja se na pumpu gdje se postavlja uvjet brzine protjecanja otopine. Na iglu se priključi izvor napona radi raspršenja polimerne otopine. 3D izrađeni kolektori postavljaju se na udaljenost od 18 cm od šprice s iglom te se ispreda u vremenu od 4 sata. Nakon 4 h isključuje se izvor napona te se elektroispredeni uzorak premješta s kolektora i sprema za daljnju analizu.



Slika 17. Uređaj za elektroispredanje na Tekstilno-tehnološkom fakultetu u Zagrebu

3.5. Karakterizacija elektroispredjenih materijala

3.5.1. Elektronskipretražni mikroskop (SEM) – izgled površine nosača

Za određivanje morfologije vlakana te izgled površine elektroispredjenih materijala uzorci su snimljeni na pretražnom elektronskom mikroskopu SEM QUANTA 250, FEI, Slika 18. Prije snimanja uzorci su pripremljeni nanošenjem tankog sloja zlata kako bi postali elektrovodljivi. Uzorci su snimljeni na nekoliko različitih mjesta s uvećanjima od 5 000 do 10 000 puta.



Slika 18. SEM mikroskop QUANTA 250, FEI [28]

3.5.2. Veličina pora i distribucija promjera pora

Raspodjela veličina pora čistog PCL elektroispredjenog vlaknastog mata i elektroispredjenih vlaknastih matova koji su elektroispredjeni na kolektoru 1-3 i kolektoru 4-6 određena je pomoću uređaja ASAP 2000 (Slika 19). Određivanje strukture pora i njihove raspodjele temelji se na BET (Brunauer, Emmett, Teller) metodi, koja polazi od pretpostavke da su sve pore cilindričnog oblika. Mjeri se volumen plina, u ovom slučaju dušika, adsorbiranog u porama u ovisnosti o parcijalnom tlaku pri konstantnoj temperaturi. S obzirom da su u stvarnim sustavima pore rijetko idealnog cilindričnog oblika, promjer pora se izražava ekvivalentnim promjerom iz volumena plina, V , i površine pora, A , prema izrazu (9):

$$d_{ekv} = 4 \cdot \frac{V}{A} \quad (9)$$

Na osnovi dobivenih rezultata može se izračunati raspodjela veličina pora prema relaciji (10):

$$Q_3(x) = \frac{\Delta V}{\Delta x} \quad (10)$$

gdje je $Q_3(x)$ kumulativni udio veličine pora manjih od x .

Iz dobivenih podataka o raspodjeli veličina pora može se odrediti udio pojedine veličine pora i njihova srednja veličina, te količina mikropora.



Slika 19. Uređaj za određivanje raspodjele volumena pora, ASAP 2000

3.5.3. Mjerenje kontaktnog kuta s vodom

Kontaktni kut određen je metodom viseće kapi (*Sessile drop*) pomoću uređaja za mjerenje kontaktnog kuta, goniometra, DataPhysics OCA 20 Instruments GmbH (Slika 20.). Provedeno je mjerenje za PCL elektroispređeni mat i 6 elektroispređenih matova na kolektorima. Volumen kapljice vode koji je nanešen na uzorke varirao je od 1.000 μL do 5.000 μL . Na svaki je uzorak nanešeno 5-10 kapljica te je nakon 30 sekundi mjeren kontaktni kut. Potom su izračunate srednje vrijednosti kontaktnog kuta za svaki uzorak.



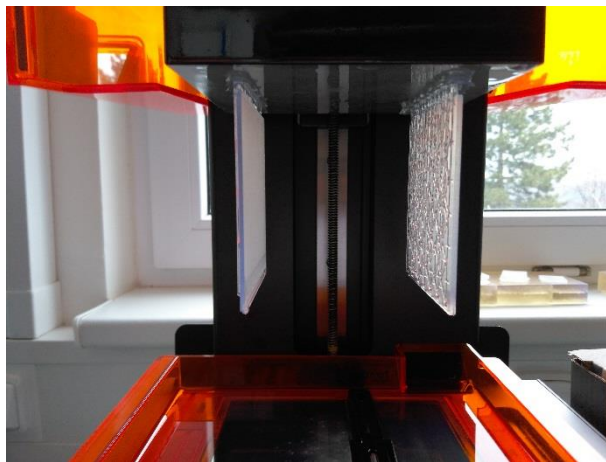
Slika 20. Goniometar, DataPhysics OCA 20 Instrument

4. REZULTATI MJERENJA I RASPRAVA

4.1. Izrada kolektora postupkom 3D printanja

Za izradu kolektora postupkom 3D printanja korištena je standardna fotoreaktivna prozirna smola na bazi estera metakrilne kiseline i foto-inicijatora.

Rezolucija korištena za printanje kolektora je 25 μm (rezolucija printera kreće se od 25-100 μm). Izrađeno je šest različitih kolektora od toga tri kolektora s paralelnim kanalićima i po tri kolektora s kvadratnim udubinama. Kod ovih kolektora varirana je dimenzija kanalića odnosno kvadratnih udubina kako je opisano u poglavlju 3.3.1. Na slici 21. prikazan je kolektor izrađen 3D printanjem (kolektor na printeru).

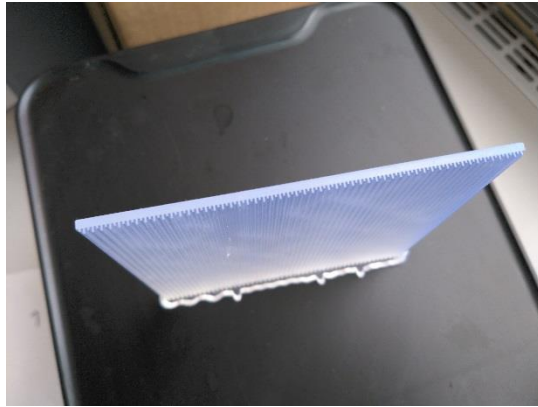


Slika 21. 3D printer s isprintanim kolektorom

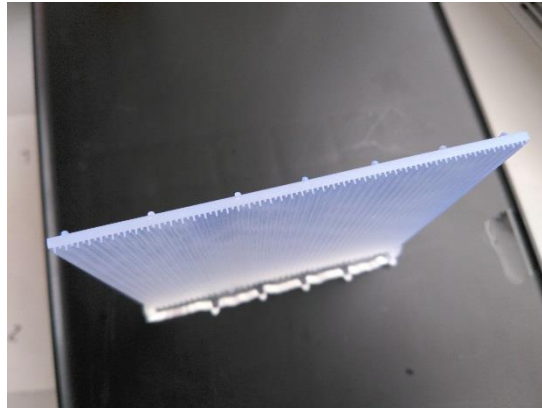
Na slici 22. prikazani su isprintani kolektori 1, 2 i 3 (kolektori s paralelnim kanalićima pri širini kanala, kod kolektora 1 širina kanala je 0.6 mm, kod kolektora 2 je 0.8 mm a kod kolektora 3 je 1 mm) i kolektori 4, 5 i 6 (kolektori s kvadratnim udubinama-kolektor 4 je širine 0.6 mm, kolektor 5 je širine 0.8 mm, a kolektor 6 je 1 mm).

Kako bi kolektori imali svojstvo električne vodljivosti na svaki kolektor nanesen je grafitni sloj, slika 23.

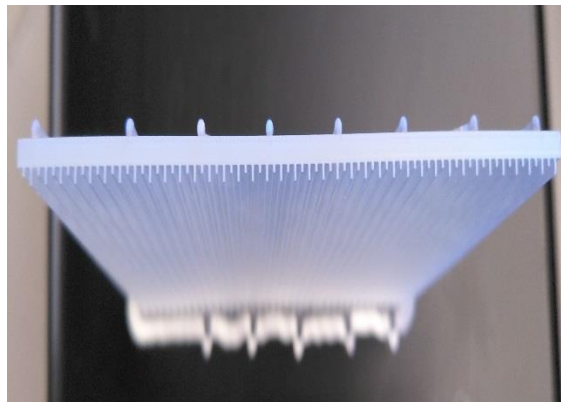
a)



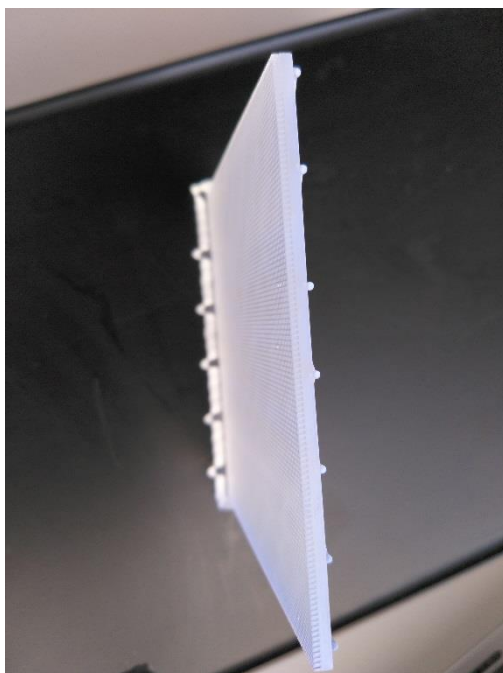
b)



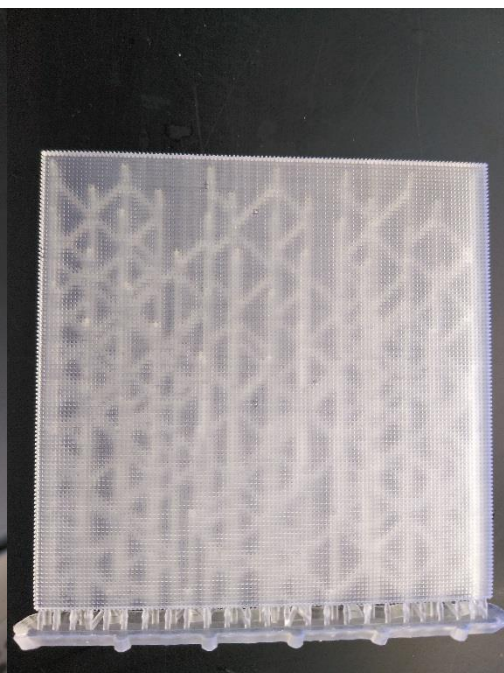
c)



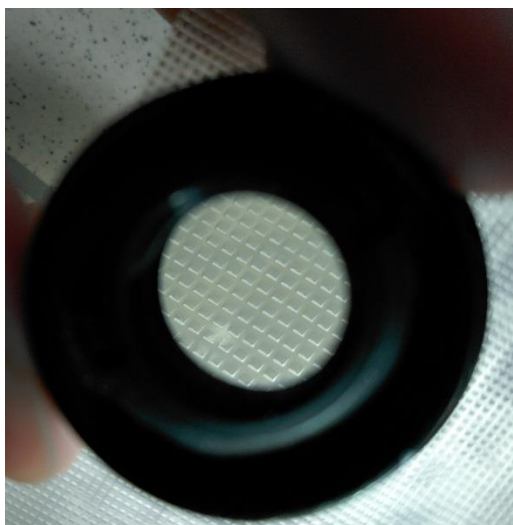
d)



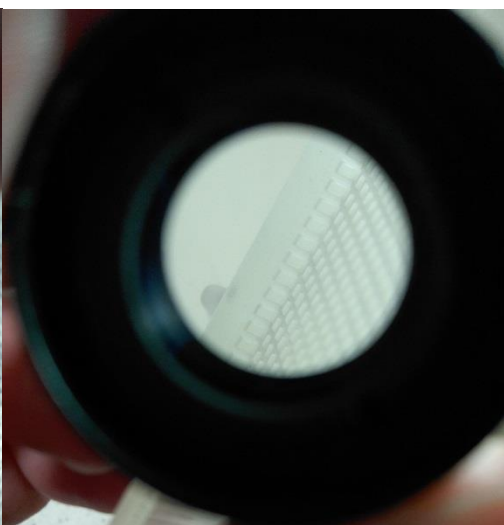
e)



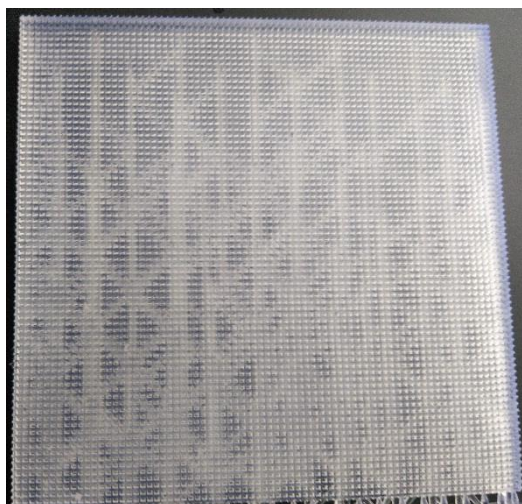
f)



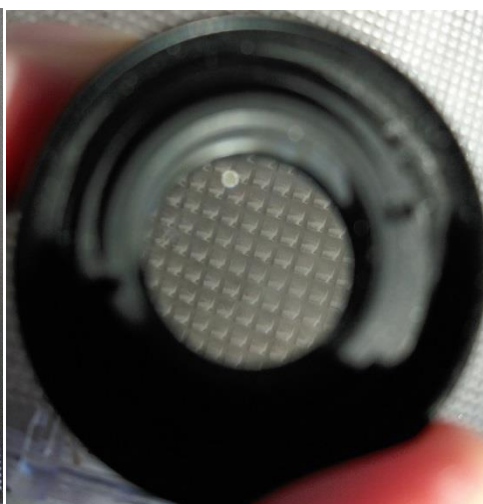
g)



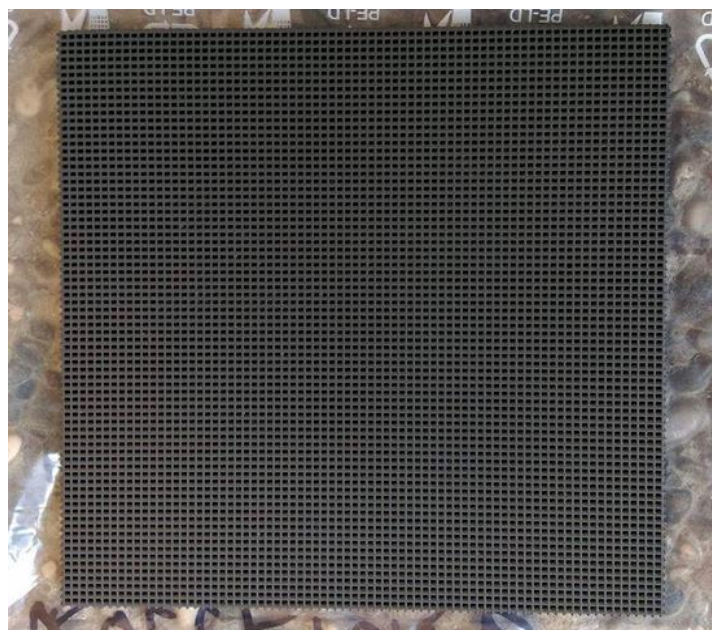
h)



i)



Slika 22. Prikaz geometrije i izgleda kolektora: 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d,e), 5 (f,g) i 6 (h,i)



Slika 23. Primjer kolektora s kvadratnim udubinama s nanešenim grafitnim slojem

Elektroispredeni vlaknasti nosači dobiveni su postupkom elektroispredanja iz otopine koja je dobivena otapanjem čistog PCL u glacijalnoj kiselini i etanolu.

Struktura elektroispredenih vlaknastih nosača dobivenih na kolektoru prikazana je na slici 24. Ova specifična topografija elektroispredenog vlaknastog mata potrebna je kako bi na njima zasijane fibroblastne stanice rasle i migrirale prema obliku površine elektroispredenog vlaknastog nosača, tj. da stvaraju tkivo s navedenom 3D mikrogeometrijom strukture elektroispredenog vlaknastog mata.

a)



b)

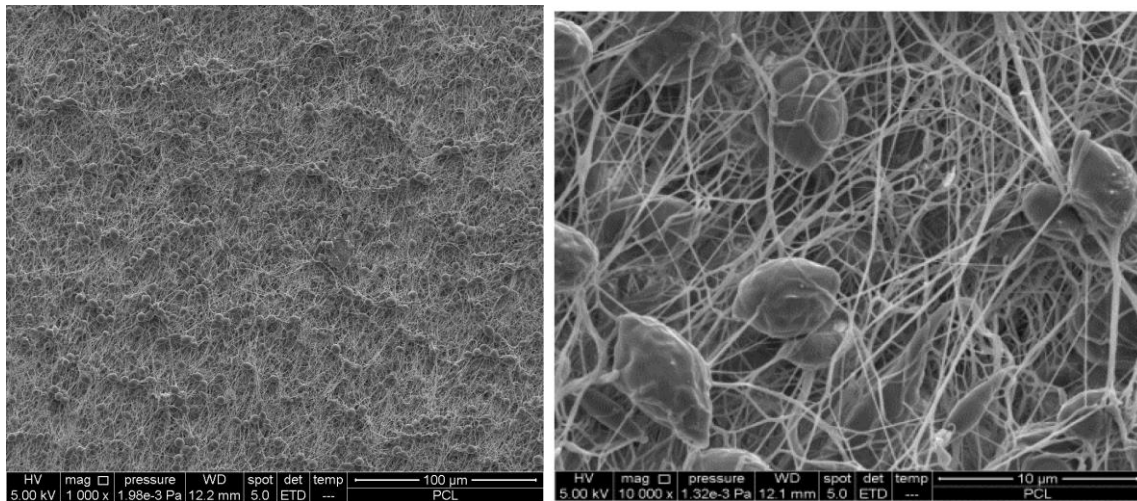
c)



Slika 24. Fotografije strukture elektroispredenih vlaknastih nosača (a) na rotirajućem cilindru (b) paralelni kanalići i (c) kvadratne udubine

4.2. Određivanje morfološke strukture elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM)

Morfološka struktura elektroispredenog PCL vlaknastog nosača dobivenog elektroispredanjem na rotirajućem cilindru prikazana je na slici 25., vidljiva je cilindrična struktura vlakana s pojavom nasumično raspoređenih deformacija (grudice) okruglog oblika po duljini vlakana na nano i mikrorazini.

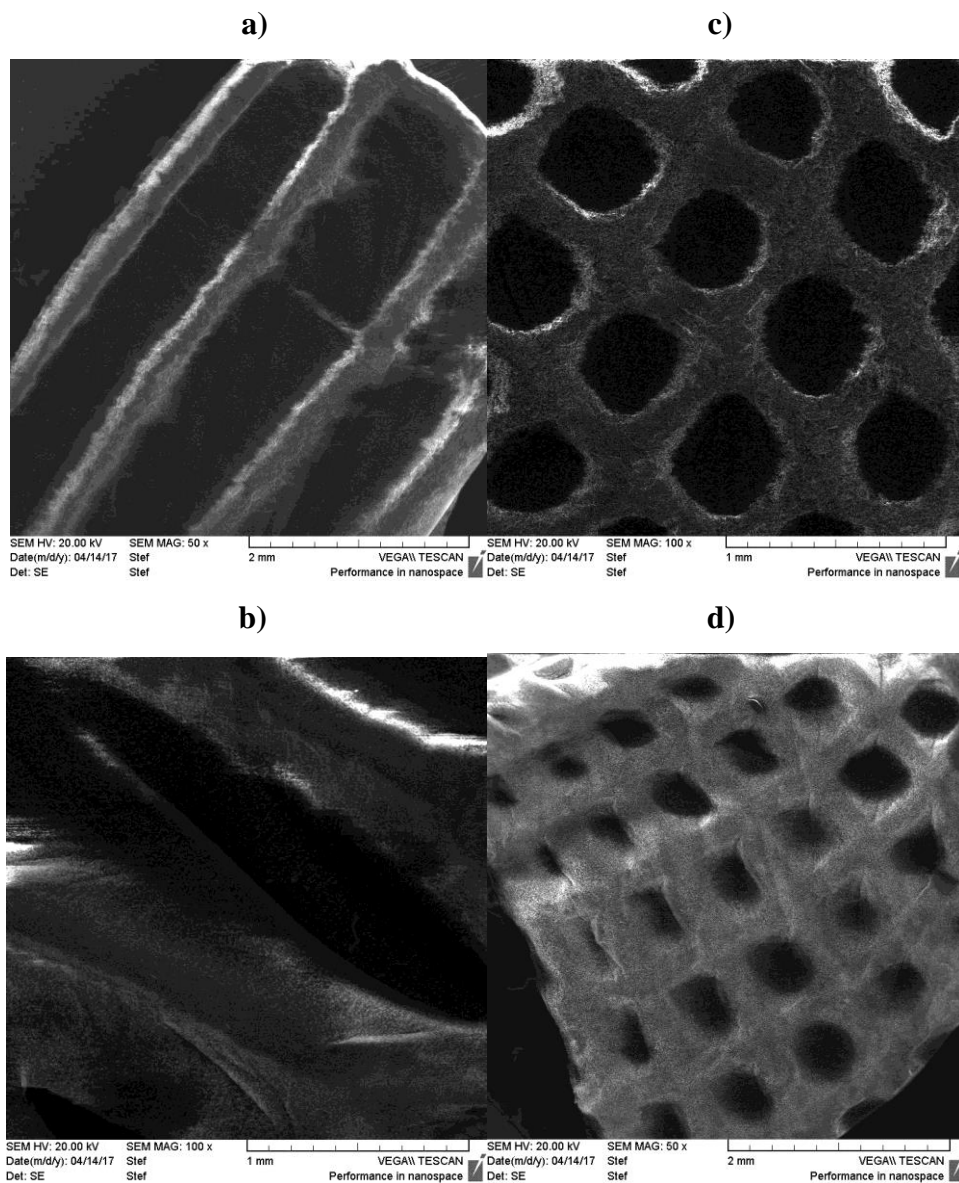


Slika 25. SEM mikrografije PCL elektroispredenog vlaknastog nosača dobivenog elektroispredanjem na rotirajućem cilindru, povećanje 1000 i 10 000 x

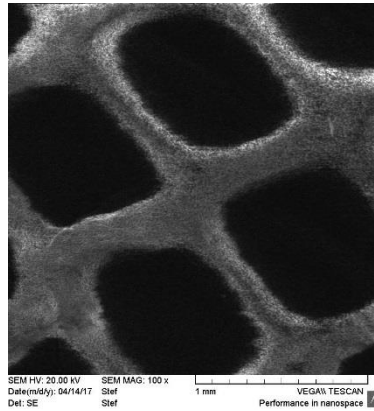
Morfološka struktura PCL elektroispredenog vlaknastog nosača dobivenog elektroispredanjem na kolektoru 1, 2 i 3 (paralelni kanalići) te kolektoru 4, 5, 6 (kvadratne udubine) određena SEM analizom prikazana je na slici 26.

Na osnovi SEM mikrografija može se vidjeti da je dobivena porozna struktura elektroispredenih vlaknastih nosača koja prati strukturu kolektora na kojima je vršeno elektroispredanje (Slika 26). Ovakva struktura elektroispredenih vlaknastih nosača na koje bi se posijale stanice omogućila bi efektivnu penetraciju stanica u udubine na matu kao i područja za koje se stanice trebaju pričvrstiti.

Svrha izrade 3D printanog kolektora s ciljanom geometrijom je omogućiti dvostruku poroznost nosača (elektroispređenog vlaknastog nosača), tj. mikro pore dovoljno velike za penetraciju stanica u dublje slojeve nosača i nano pore dovoljno male za adheziju receptora stanica, prijenos nutrijenata i kisika, potrebnih za razvoj stanica. Na slikama se jasno vide dijelovi nosača namijenjeni za penetraciju stanica. To su paralelni kanalići (a), tj. kvadratne udubine (b) u kojima se vlakna raspoređuju paralelno ili puno rahlije, suprotno od izbočine, gdje se vlakna pozicioniraju puno kompaktnije, te na taj način formiraju pore manjih promjera.



e)



Slika 26. SEM mikrografija elektroispređenog PCL vlaknastog nosača dobivenog elektroispređanjem (a) na kolektoru 1; (b) na kolektoru 2; (c) na kolektoru 4; (d) na kolektoru 5 i (e) na kolektoru 6

4.3. Mjerenje kontaktnog kuta s vodom

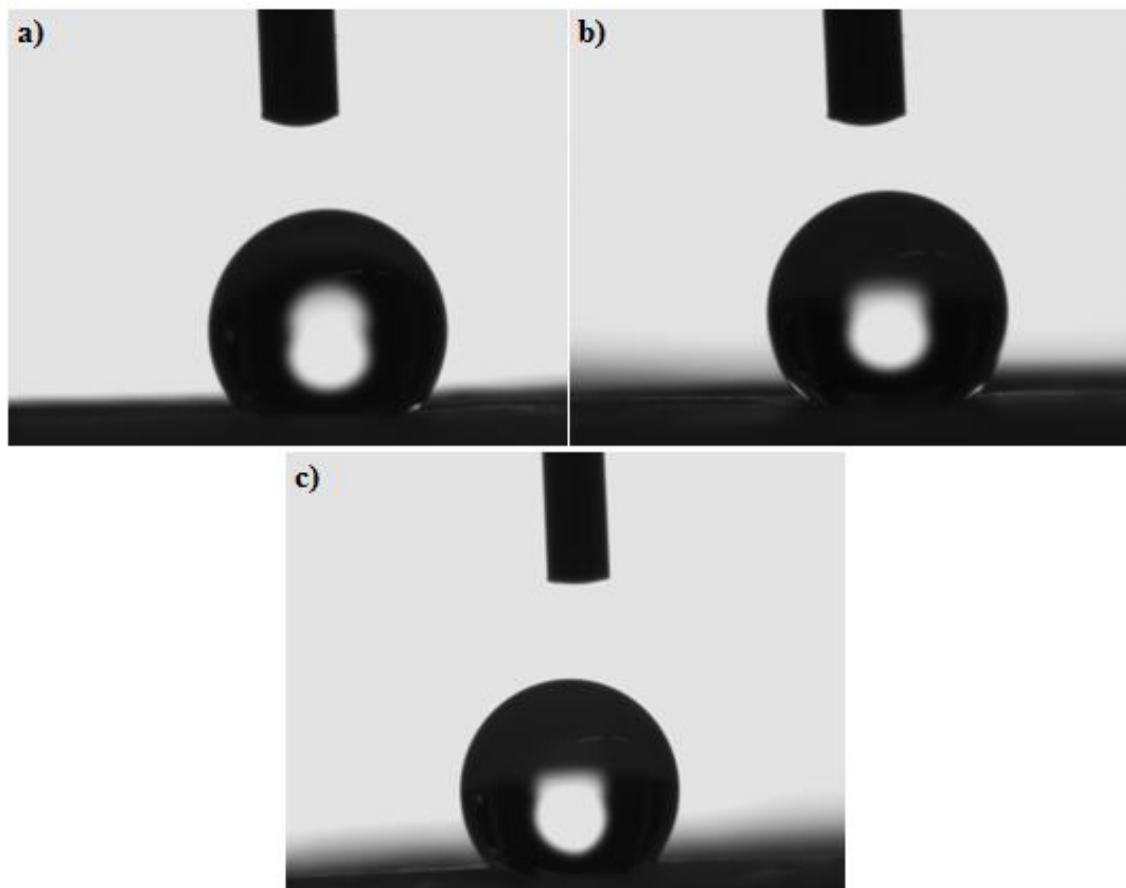
Mjerenje kontaktnog kuta igra važnu ulogu u karakterizaciji površine. On predstavlja mjeru vlaženja krutine kapljevinom. Kapljica se razlijeva po krutoj površini do uspostavljanja ravnotežnog oblika. Sile koje djeluju na periferiji kapljice čine kontaktni kut s krutom površinom. Stanje površine određuje se obzirom na njenu polarnost, homogenost i hrapavost. [36,37]

Kontaktni kut određen je metodom viseće kapi (*Sessile drop*) pomoću vode, pri čemu je ispitano vlaženje elektroispređenih PCL vlaknastih nosača istog sastava, ali različite geometrije. Iz vrijednosti kontaktnih kutova mogu se utvrditi interakcije između površine uzoraka i vode. Rezultati mjerenja prikazani su u tablici 3. pri čemu je nosač elektroispređen na rotirajućem cilindru glatke površine, elektroispređeni nosači 1,2 i 3 s paralelnim kanalićima, dok su elektroispređeni nosači 4, 5 i 6 s kvadratnim udubinama. Rezultati svih sedam ispitanih uzoraka pokazuju visoke vrijednosti kontaktnog kuta što znači da je slabo vlaženje nosača vodom. Razlog takvoj hidrofobnoj prirodi polimera PCL pripisuje se prisutnosti nepolarnih metilenskih skupina.

Tablica 3. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta s vodom elektroispredenih nosača

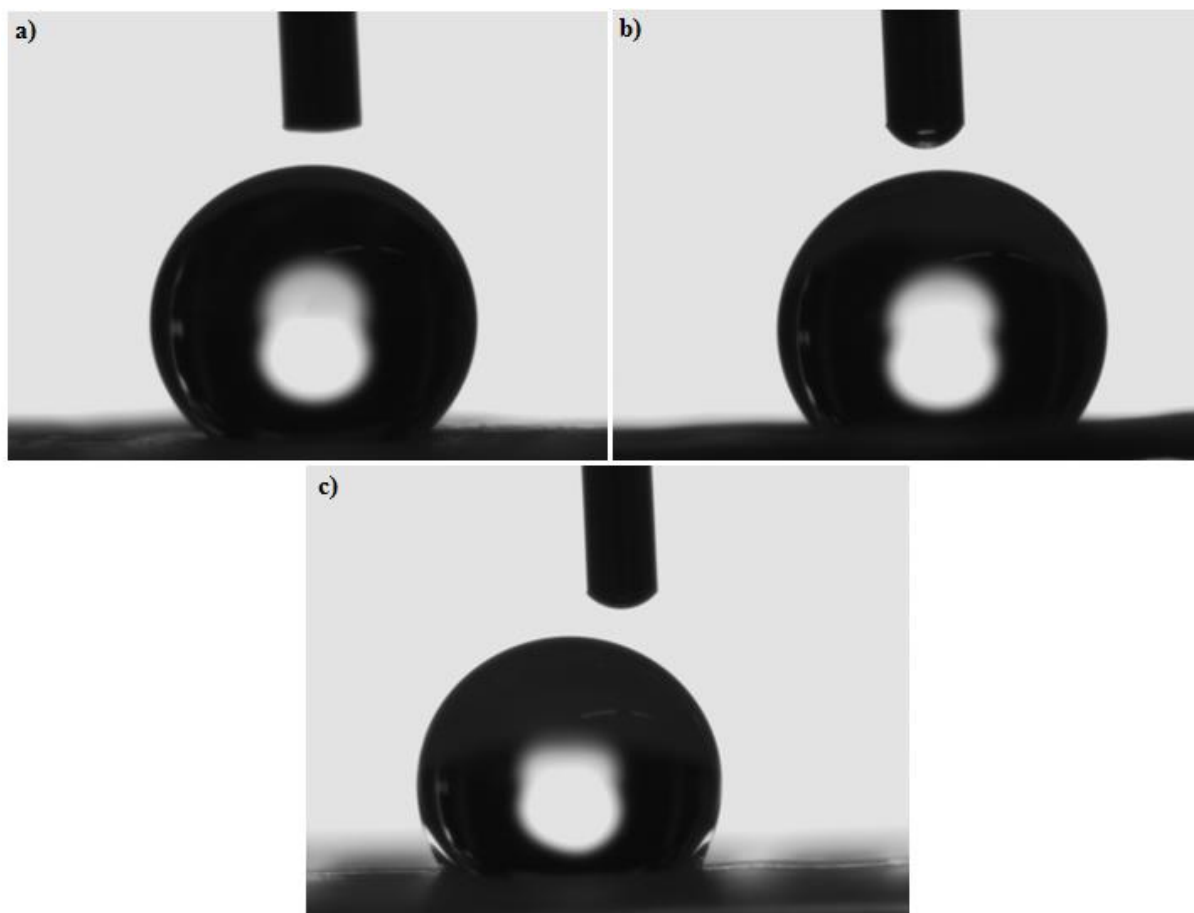
Uzorak	Vrijednosti kontaktnog kuta(θ), °
PCL nosač elektroispreden na rotirajućem cilindru	133.4
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 1	128.0 ± 2.0
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 2	144.0± 2.2
PCL nosač elektroispreden na kolektoru3	131.3± 2.0
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 4	142.3± 2.1
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 5	139.7± 1.5
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 6	139.9± 1.7

Vlaženje nosača s paralelnim kanalićima kapljicom vode prikazan je na slici 27. Iz slike te rezultata danih u tablici 3. vidljivo je da najbolje vlaženje ima nosač elektroispreden na kolektoru 1 kojeg karakterizira najmanji promjer kanalića te najmanja visina punog dijela i iznosi 128.0 ° (Slika 27.a). Najveću vrijednost kontaktnog kuta, odnosno najslabije vlaženje nosača s paralelnim kanalićima ima nosač elektroispreden na kolektoru 2 (srednji promjer vlakana i srednja visina punog dijela) i iznosi 144.0 ° (Slika 27. b). Nosači elektroispredeni na kolektoru 1 (najmanji promjer vlakana) te na kolektoru 3 (najveći promjer vlakana) pokazuju malu razliku u vrijednosti kontaktnog kuta od nosača s glatkom površinom, tj. referentnog uzorka. Vrijednost kontaktnog kuta referentnog uzorka iznosi 133.4 °.



Slika 27. Prikaz kapljice vode na nosaču elektroispredenom na a) kolektoru 1, b) kolektoru 2, c) kolektoru 3

Vlaženje nosača s kvadratnim udubinama kapljicom vode prikazano je na slici 28. Iz slike i tablično prikazanih rezultata (Tablica 3.) vidljivo je da najmanju vrijednost kontaktnog kuta ima nosač elektroispreden na kolektoru 5 kojeg karakterizira srednji promjer vlakana i iznosi 139.7° (Slika 28.b). Najveću vrijednost kontaktnog kuta, tj. najslabije vlaženje ima nosač elektroispreden na kolektoru 4 (najmanji promjer vlakana) i iznosi 142.3° (Slika 28.a). Vrijednosti kontaktnog kuta uzoraka, odnosno nosača s kvadratnim udubinama pokazuju veća odstupanja od referentnog uzorka.



Slika 28. Prikaz kapljice vode na nosaču elektroispredenom na a) kolektoru 4, b) kolektoru 5, c) kolektoru 6

Rezultati kontaktnih kutova za sve nosače pokazuju visoku hidrofobnost, osobito nosači s kvadratnim udubinama. Kako bi se smanjila hidrofobnost, odnosno poboljšale interakcije između stanica i nosača potrebno je PCL nosač obraditi. Tako se npr. PCL nosač obrađuje otopinom NaOH za povećanje hidrofilnosti. NaOH hidrolizira esterske veze PCL što rezultira karboksilnim funkcionalnim grupama na površini PCL. Karboksilne grupe pridonose manjoj hidrofobnosti površine, tj. nižoj vrijednosti kontaktnog kuta. Obrada PCL s NaOH uzrokuje nano-hrapavost zbog čega se povećava površina, a time i adhezija stanica. [38]

4.4. Određivanje veličina pora i distribucija promjera pora

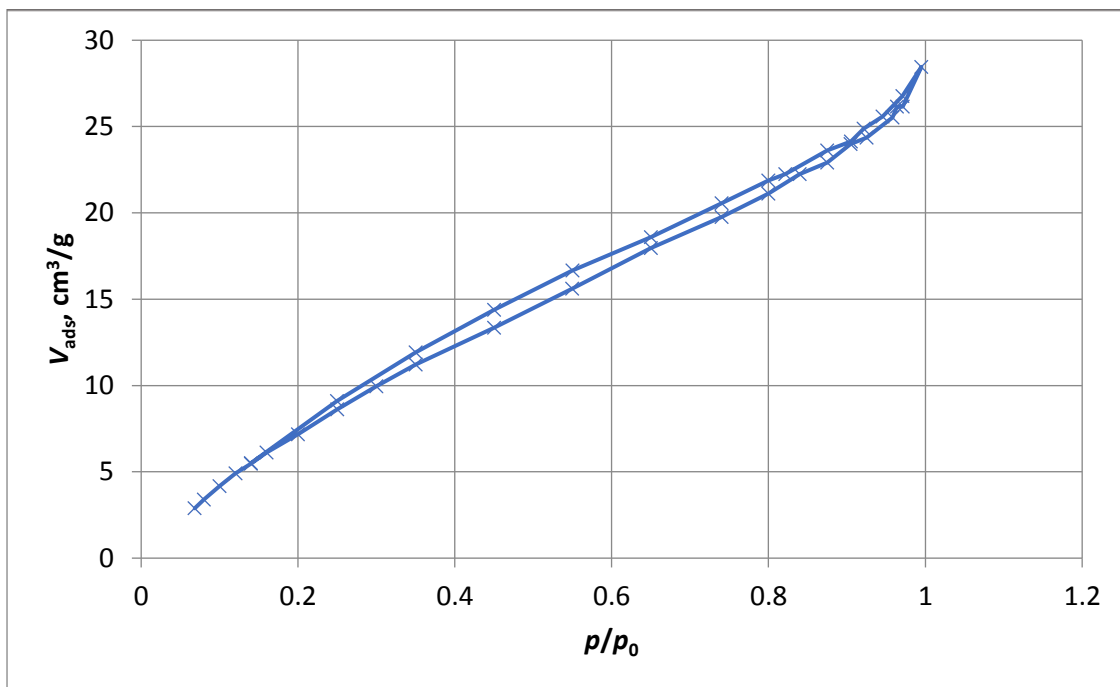
Rezultati plinske adsorpcijsko-desorpcijske analize dani su u tablici 4. i na slikama 29. - 35. Prikaz N_2 adsorpcijsko-desorpcijskih izoterma za istražene uzorke pokazuje da svi uzorci elektroispredenih nosača pokazuju izotermu tipa IV (prema BBDT klasifikaciji) [39], s karakterističnom histerezom (slike 29. - 35.) koja nastaje kao posljedica kapilarne kondenzacije u mezoporama. Početni dio izoterme vezan je uz stvaranje monosloja molekula tijekom adsorpcije. Drugi dio izoterme, uslijed termodinamičkih procesa i višeslojnog efekta pokazuje histerezu adsorpcijskog i desorpcijskog sloja. Prema IUPAC klasifikaciji, uglavnom se radi o H4 stupnju izoterme, što podrazumijeva uske pore, nepravilnog oblika te šire raspodjele veličina, a osobito se to vidi na izotermama PCL nosač elektroispredenih na kolektoru 2 (Slika 31.), 3 (Slika 32.) i 5 (Slika 34.). PCL nosač elektroispreden na kolektoru 4 (Slika 33.) ima najmanju histerezu na izotermi, gotovo identične procese adsorpcije i desorpcije te malu razliku specifičnih površina i promjera adsorpcije i desorpcije.

Rezultati dobiveni za srednji promjer pora prikazani su u tablici 4. Prema klasifikaciji pora, pore promjera iznad 50 nm smatraju se makroporama, pore prosječnog promjera 2-50 nm spadaju u mezopore dok su pore manjeg promjera, ispod 2 nm mikropore.

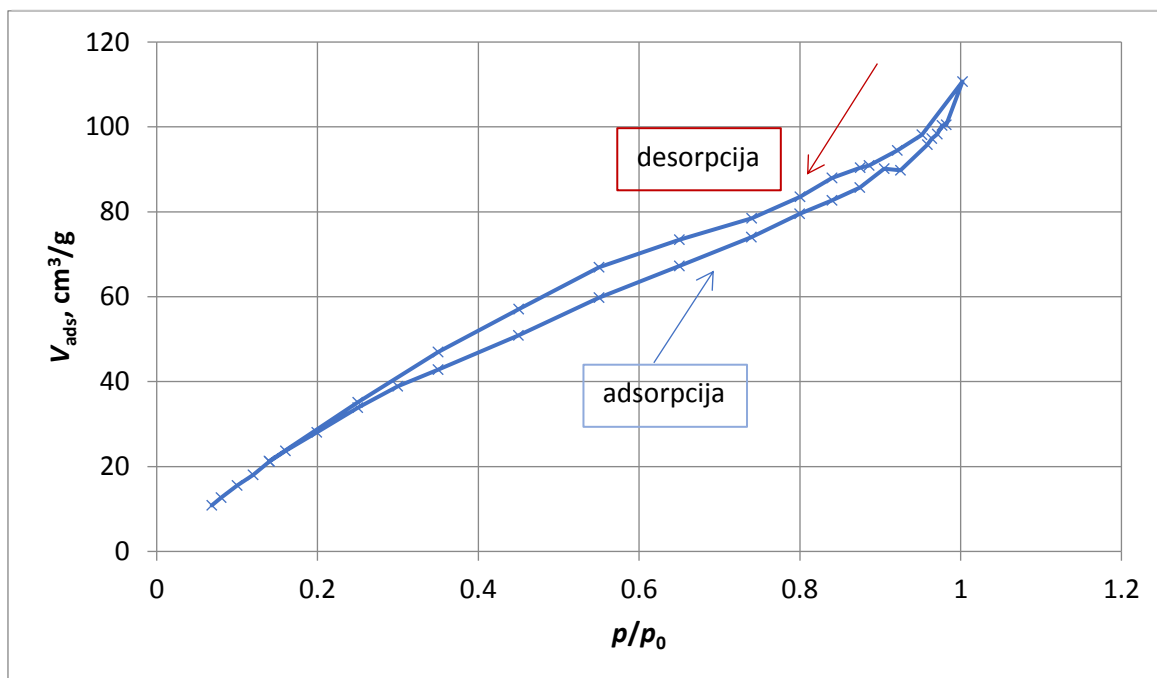
Rezultati pokazuju da se s promjenom kolektora od ravne ploče na kolektor ciljane geometrije (kolektori 1-3 – paralelni kanalići, kolektori 4-6 – kvadratne udubine) srednji promjer pora ne mijenja značajno i PCL elektroispredeni nosači sadrže mezopore, prosječnog promjera oko 3 nm. Najmanji prosječni promjer pora ima PCL nosač elektroispreden na kolektoru 4. Srednji promjer pora je vrlo mali u odnosu na zahtjeve veličine ljudskih stanica (raspon od 30-80 μm), koje bi trebale proći s površine, kroz otvor pora, u donje slojeve nosača. To ukazuje da se vlakna vrlo gusto pozicioniraju jedna na druge, te stoga zatvaraju međuprostore. Ovo se može riješiti promjenom udaljenosti između uzdužnih i poprečnih izbočina na kolektorima. Međutim, vrlo bitno zapažanje vezano je uz specifičnu površinu elektroispredenih materijala, a to je da se ispredanjem na kolektorima 3D geometrije dobivaju upravo poželjne 3D strukture nosača koji rezultiraju i s više od 4 puta većom specifičnom površinom. Veća specifična površina je vrlo pogodna za adheziju tj. veći broj mjesta za vezivanje stanica, rast, diferencijaciju i proliferaciju zasijanih stanica.

Tablica 4. Rezultati specifične površine, volumena pora i srednjeg promjera pora za čisti PCL i kolektore 1-6 određeni na osnovi plinske adsorpcijsko-desorpcijske analize

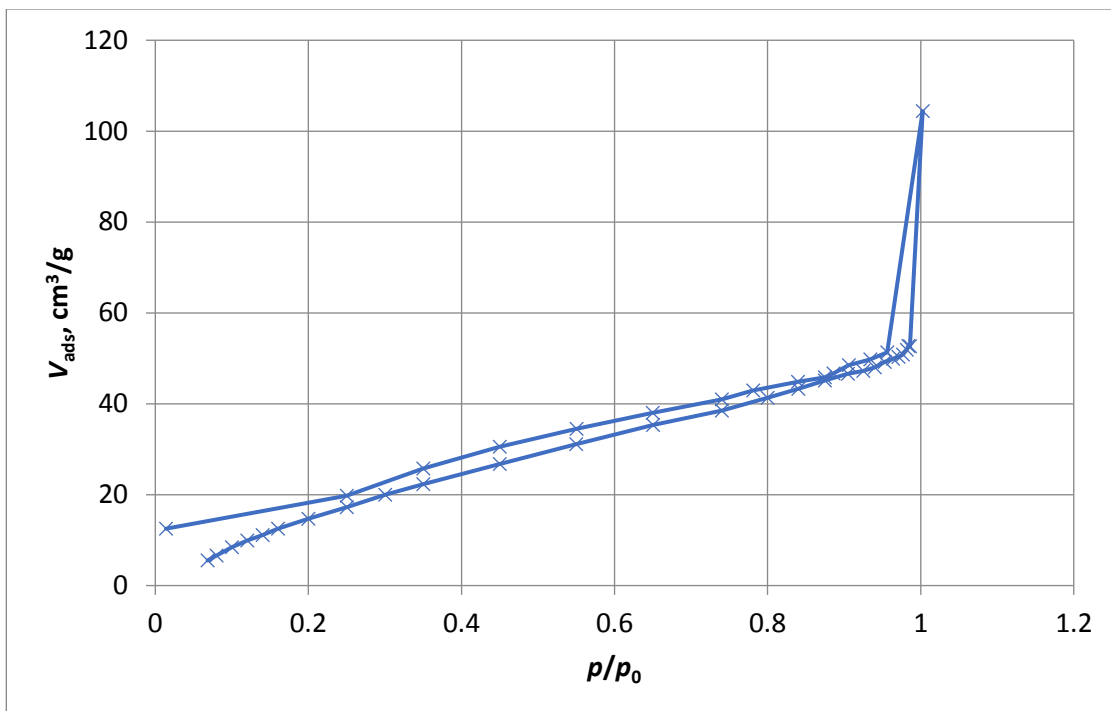
Elektroispredeni vlaknasti nosač	Spec. površina S_{BET}, m^2g^{-1}	Sr. promjer pora d_p, nm
PCL nosač elektroispreden na rotirajućem cilindru	47.2444	3.7268
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 1	200.2695	3.4198
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 2	109.9669	2.9679
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 3	128.3519	3.1348
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 4	210.2166	2.7724
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 5	45.4956	3.6185
PCL nosač elektroispreden na kolektoru 6	95.8157	3.7091



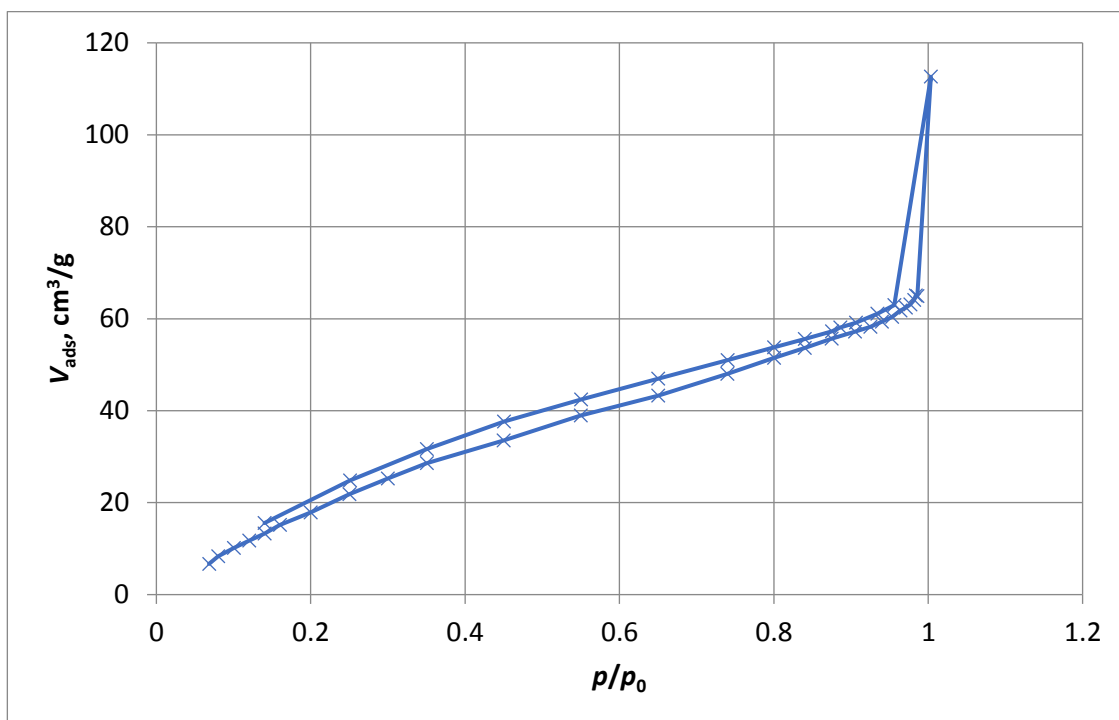
Slika 29. N_2 adsorpcijsko-desorpcijska izoterma za PCL nosač elektroispreden na rotirajućem cilindru



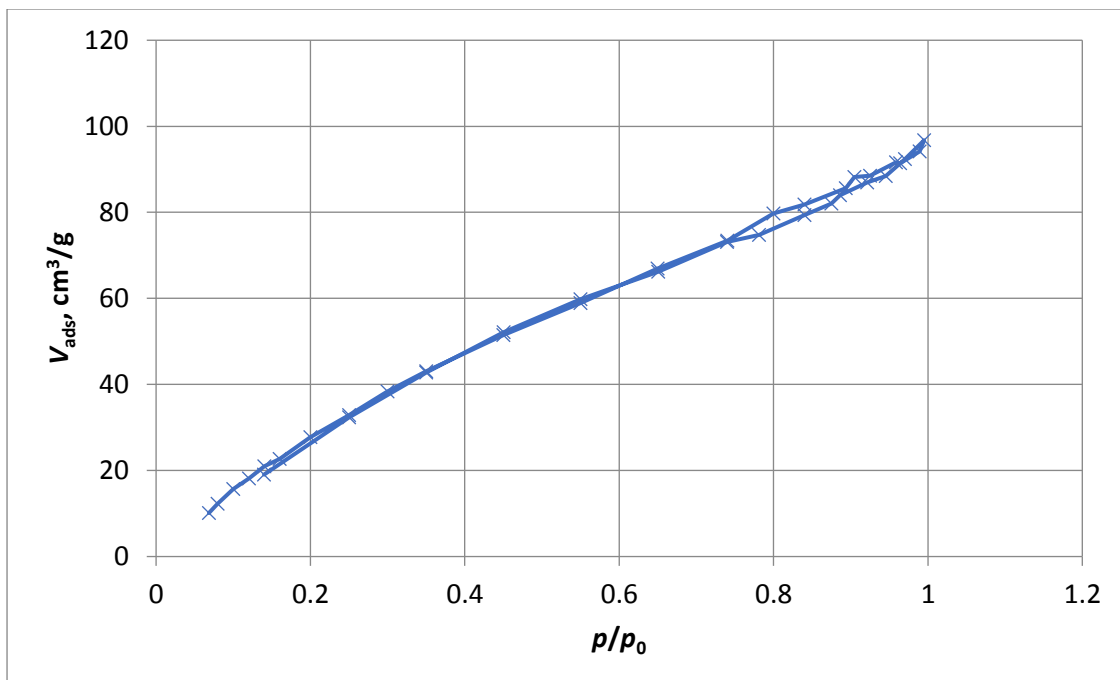
Slika 30. N_2 adsorpcijsko-desorpcijska izoterma za PCL nosač elektroispreden na kolektoru 1



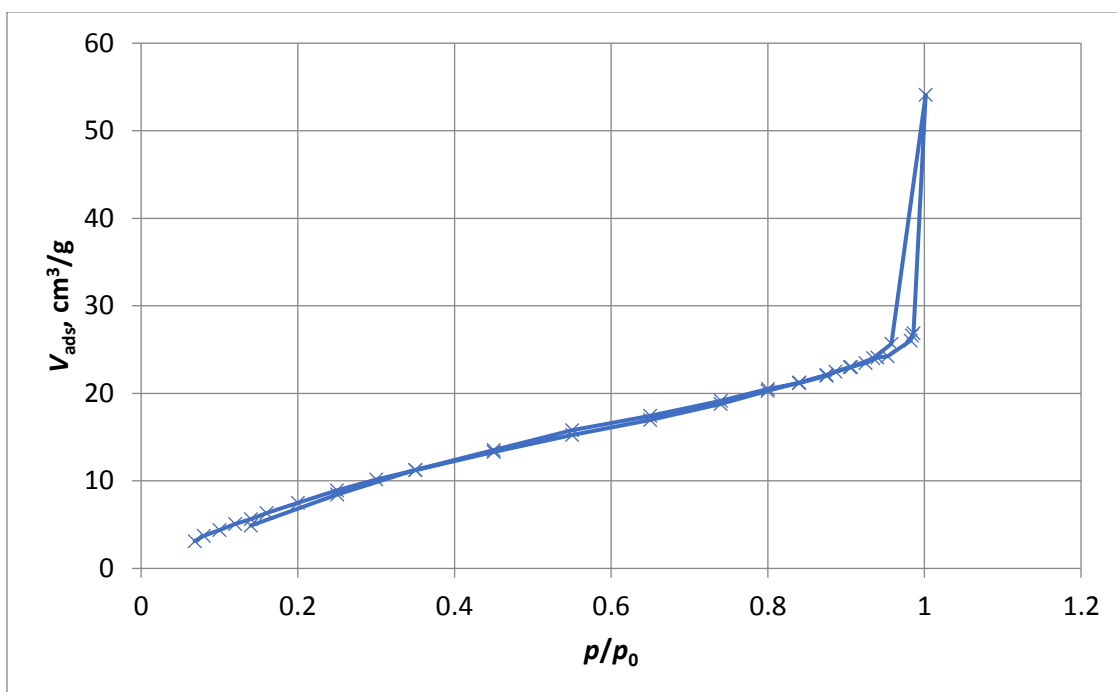
Slika 31. N₂ adsorpcijsko-desorpcijska izoterma za PCL nosač elektroispreden na kolektoru 2



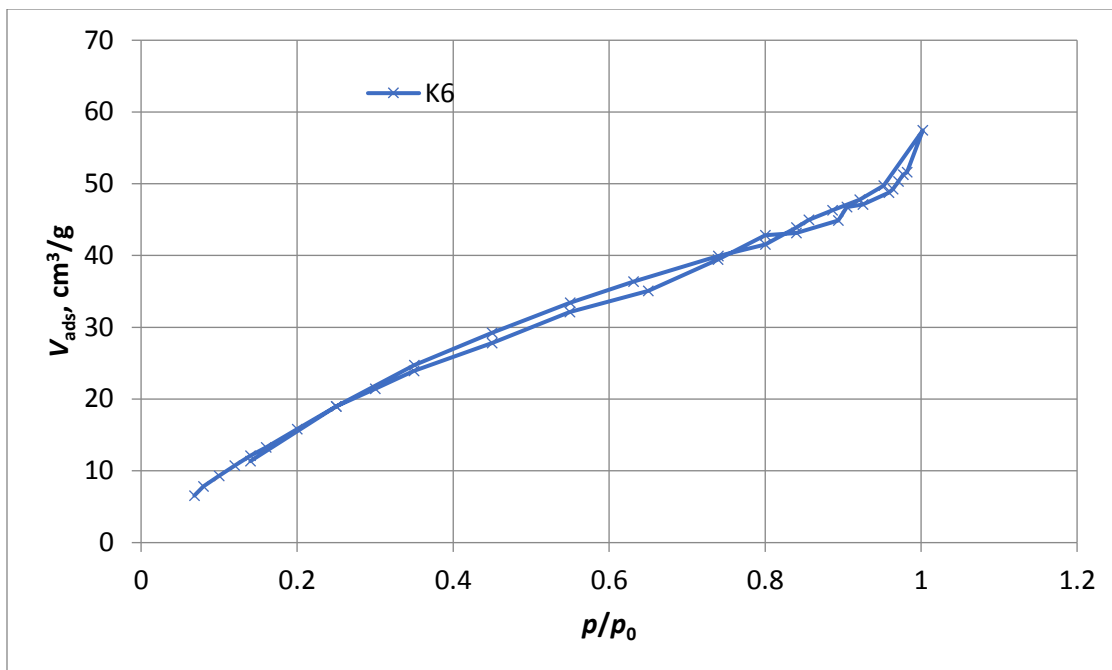
Slika 32. N₂ adsorpcijsko-desorpcijska izoterma za PCL nosač elektroispreden na kolektoru 3



Slika 33. N_2 adsorpcijsko-desorpcijska izoterma za PCL nosač elektroispreden na kolektoru 4

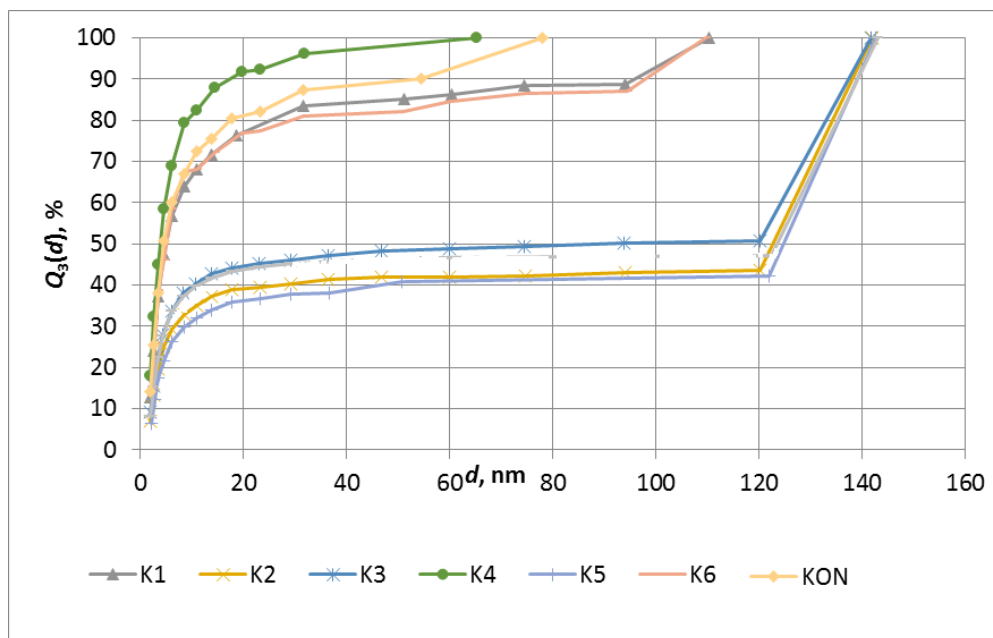


Slika 34. N_2 adsorpcijsko-desorpcijska izoterma za PCL nosač elektroispreden na kolektoru 5



Slika 35. N₂ adsorpcijsko-desorpcijska izoterma za PCL nosač elektroispreden na kolektoru 6

Kumulativna funkcija raspodjele, $Q_3(x)$, također pokazuje da PCL nosač elektroispreden na kolektoru 4 ima najniži medijan raspodjele, x_{50} , odnosno da je 50 % pora kod ovog uzorka manjeg promjera od ostalih ispitivanih uzoraka. Prema slici 36. kumulativnih funkcija raspodjele može se vidjeti da PCL nosači elektroispredeni na kolektoru 2, 3 i 5 imaju širu raspodjelu veličine pora, veličina pora iznosi i do 140 nm.



Slika 36. Usporedba kumulativnih funkcija raspodjele, $Q_3(x)$, za sve PCL elektroispredene nosače

4.5. Primjer primjene elektroispredjenih nosača

Primjer primjene elektroispredjenih nosača (elektroispredjeni vlaknasti mat) za uzgoj limbalnih stanica napravljen je u suradnji Tekstilno-tehnološkog fakulteta, laboratorija za elektroispredanje i Kliničke jedinice Banka tkiva KBC SM - Klinike za traumatologiju u Zagrebu. Korišteni materijal je PCL, koji je obrađen s otopinom NaOH nakon elektroispredanja, s ciljem postizanja hidrofilnosti.

4.5.1. Postupak izolacije i zasijavanja stanica na PCL elektroispredjenom nosaču

Ljudske limbalne stanice su izolirane iz korneoskleralnog diska nakon keratoplastike, operacije oka s ciljem transplantacije, od 9 donora. Nakon dezinfekcije PCL nosača pod UV svjetlom i hidratacije sa 70%, 50%, 25% otopinom etanola, deionizirane vode i HBSS soli, radi se zasijavanje limbalnih stanica s hranjivim slojem 3T3 stanica. Test vijabilnosti je napravljen 8 dana nakon zasijavanja na temelju izmjerene fluorescencije na fluorometru. Metabolički aktivne stanice održavaju sposobnost reduciranja bojila resazurin u visoko fluorescentno bojilo resorufin. Indirektna imunocitokemija izvršena je pomoću mišjih antitijela kako bi se utvrdio pozitivan marker na p63 protein.

Iako PCL elektroispredeni nosači pokazuju manju vijabilnost u odnosu na prirodne nosače (npr. amniotska membrana), istovremeno pokazuju i visoki postotak stanica pozitivnih na marker p63. To znači da ove stanice mogu dalje stvoriti nove kolonije stanica jer su manje diferencirane. Obzirom na svoje prednosti poput fleksibilne geometrije, izdržljivosti, podesive hidrofилности, pa i funkcionalizacije prema potrebama pacijenta svakako su izvrsni kandidati za buduća istraživanja u terapijskim svrhama. [40]

5. ZAKLJUČAK

Karakteristike PCL nosača različite geometrije ispitane su primjenom nekoliko metoda. Primjenom SEM analize vidljivo je da je ostvarena željena porozna struktura PCL nosača elektroispredenih na 3D printanim kolektorima ciljane geometrije. Takva dvostruka pozorna struktura omogućuje zasijavanje i pričvršćivanje stanica te prijenos nutrijenata i kisika što je važno za razvoj stanica.

Mjerenjem kontaktnog kuta s vodom elektroispredeni PCL nosači su pokazali vrlo slabe interakcije s vodom. To osobito vrijedi za nosače s kvadratnim udubinama. Zbog toga je PCL nosače kako bi se mogli uspješno primjenjivati u biomedicinske svrhe, potrebno obraditi u svrhu smanjenja hidrofobnosti, povećanja nano-hrapavosti i adhezije stanica.

Rezultati plinske adsorpcijsko-desorpcijske analize pokazuju da se s promjenom kolektora srednji promjer ne mijenja značajno. Srednji promjer pora je vrlo mali u odnosu na zahtjeve veličine ljudskih stanica. Za povećanje srednjeg promjera pora potrebno je promijeniti udaljenost između uzdužnih i poprečnih izbočina na kolektorima. Rezultati su pokazali i jednu vrlo značajnu prednost, a to je da 3D struktura nosača rezultira i s više od 4 puta većom specifičnom površinom. Veća specifična površina je vrlo pogodna za adheziju tj. veći broj mjesta za vezivanje stanica, rast, diferencijaciju i proliferaciju zasijanih stanica.

Rezultati primjene elektroispredenih PCL nosača za zasijavanje ljudskih limbalnih stanica pokazali su da obzirom na svoje prednosti PCL nosači predstavljaju izvrsne kandidate za buduća istraživanja u terapijskim svrhama.

6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

π - ukupna poroznost

$\rho_{\text{nosača}}$ - prividna gustoća nosača (kgm^{-3})

$\rho_{\text{materijala}}$ - gustoća materijala (kgm^{-3})

V_1 - poznati volumen tekućine koji se koristi za uranjanje nosača (m^3)

V_2 - volumen tekućine i tekućinom impregniranog nosača (m^3)

V_3 – preostali volumen tekućine kada se ukloni tekućinom impregnirani nosač (m^3)

V_{krutina} - volumen krutine (m^3)

V_{ukupni} - ukupni volumen nosača (m^3)

p - primijenjeni tlak na vrhu (Pa)

ρ – gustoća vode (kgm^{-3})

g – gravitacijsko ubrzanje ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)

h – ukupna visina sustava (m)

Q – volumen tekućine koji prolazi kroz nosač tijekom vremena t (m^3s^{-1})

η – viskoznost tekućine (Pas)

h_s – debljina nosača (nm)

F – poprečni presjek nosača okomit na protok tekućine

T – permeabilnost (Hm^{-1})

r - radijus pora (nm)

D – veličina pora (nm)

Y - površinska napetost tekućine (Nm^{-1})

θ – kontaktni kut tekućine ($^{\circ}$)

Δp – razlika tlaka (Pa)

d_{ekv} – ekvivalentni promjer pora (nm)

V – volumen plina (m^3)

A – površina pora (nm^2)

$Q_3(x)$ - kumulativni udio veličine pora manjih od x

AFM - mikroskop atomskih sila

AM – aditivna proizvodnja (Additive Manufacturing)

ATR-FTIR - spektroskopija Fourierovom transformacijom u infracrvenom području uz dodatak za površinsku analizu

CAD – računalom potpomognut dizajn (Computer Aided Design)

EA - elementarna analiza

ECM – izvanstanična matrica (Extracellular matrix)

EDS - energetski disperzivna rendgenska spektroskopija

FESEM - pretražni elektronski mikroskop s emisijom polja

FTIR - infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom

GPC - gel permeacijska kromatografija

HA - hijaluronska kiselina

HBSS – Hankova izbalansirana otopina (Hank's Balanced Saline Solution)

Mikro – CT -mikroračunalna tomografija slikanja (Microcomputed tomography imaging)

MIT - Massachusetts Institute of Technology

NaOH – natrijev hidroksid

NMR - nuklearna magnetna rezonancija

PCL - polikaprolakton

PGA - poliglikolna kiselina

PLGA - polilaktično-glikolna kiselina

PLLA – poli (L-laktična kiselina)

PVC - polivinil-klorid

RP - sustav ubrzanog prototipiranja (Rapid Prototyping)

SEM - pretražna elektronska mikroskopija (Scanning Electron Microscopy)

STL – stereolitografija (StereoLithography)

TCP - trikalcijev fosfat

TEM - transmisijski elektronski mikroskop

2D – dvodimenzionalno

3D – trodimenzionalno

7. LITERATURA

1. Bhardwaj, N., Kundu, S.C., Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol. Adv.*, **28** (2010) 325-347.
2. Angamma, C.J., Jayaram, S.H., Fundamentals of electrospinning and processing technologies, *Part. Sci. Technol.*, **34** (2016) 72-82.
3. <http://verdextech.com/Core-Tech/Nanofibers-Explained> (pristup 2. lipnja 2017.)
4. Sill, T.J., von Recum, H.A., Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials*, **29** (2008) 1989-2006.
5. Lagerwall, J.P.F., Liquid Crystal-Functionalized Nano- and Microfibers Produced by Electrospinning u: Li, Q., *Liquid Crystals Beyond Displays: Chemistry, Physics and Applications*, John Wiley & Sons, **7** (2012) 251-284.
6. Peran, J., Ercegović Ražić, S., Mikrovlakna - proizvodi visoke tehnologije, *Tekstil* **63** (2014) 126-133.
7. Espinal, L., Porosity and Its Measurement u Characterization of Materials, Second Edition, New York, John Wiley and Sons, Wiley online library (2012).
8. Zhu, J., Jasper, S., Zhang, X., Chemical characterization of electrospun nanofibers u: Afshari, M., *Electrospun Nanofibers*, 1st Edition, Woodhead Publishing, (2016) 181-206.
9. Thandavamoorthy, S., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S., Ramkumar, S.S., Electrospinning of Nanofibers, *J.Appl.Polym. Sci.*, **96** (2005) 557-569.
10. Kumar, P., Effect of collector on electrospinning to fabricate aligned nanofiber, Department of Biotechnology & Medical Engineering, National Institute of Technology, Rourkela, India, 2011-2012, str.13.
11. Čipčić, T., Utjecaj količine antibiotika na svojstva elektrosprednog polikaprolaktona kao podloge za kontroliranu terapiju oka, *Tekstilno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu*, 2017.
12. Ficai, D., Grumezescu, A.M., *Nanostructures for Novel Therapy: Synthesis, Characterization and Applications*, Elsevier, 2017, str. 296.
13. Pilipović, A., Utjecaj parametara izrade na svojstva polimernoga prototipa, *Doktorski rad, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu*, 2012.
14. Matuško, J., Kolonić, F., 3D tisak kao tehnologija za izradu brzih prototipova, predavanje 4., kolegij Mehatronički sustavi, *Fakultet elektrotehnike i računarstva*, 2016.-2017.

15. <http://www.womeninadria.com/3d-printanje-od-ideje-proizvoda-u-nekoliko-minuta/> (pristup 10. lipnja 2017.)
16. Rogers, C.M., Morris, G.E., Gould, T.W., Bail, R., Toumpaniari, S., Harrington, H., Dixon, J.E., Shakesheff, K.M., Segal, J., Rose, F.R., A novel technique for the production of electrospun scaffolds with tailored three-dimensional micro-patterns employing additive manufacturing, *Biofabrication*, **6** (2014) 035003.
17. Horst, M., Milleret, V., Nötzli, S., Madduri, S., Sulser, T., Gobet, R., Eberli, D., Increased porosity of electrospun hybrid scaffolds improved bladder tissue regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **102** (2014) 2116-2124.
18. Zoričić Cvek, S., Đudarić, L., Cvijanović, O., Šantić, V., Sućec, M., Legović, D., Šestan, B., Primjena bioloških principa u pospješivanju cijeljenja i regeneracije zglobne hrskavice, *medicina fluminensis*, **51** (2015) 494-502.
19. Moroni, L., Elisseff, J.H., Biomaterials engineered for integration, *Mater. Today*, **11** (2008) 44-51.
20. O'Brien, F.J., Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater. Today*, **14** (2011) 88-90.
21. Stratton, S., Shelke, N.B., Hoshino, K., Rudraiah, S., Kumbar, S.G., Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering, *Bioact. Mater.*, **1** (2016) 93-108.
22. Chan, B.P., Leong, K.W., Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations, *Eur. Spine. J.*, **17** (2008) 467-479.
23. Matassi, F., Nistri, L., Chicon Paez, D., Innocenti, M., New biomaterials for bone regeneration, *Clin. Cases. Miner. Bone. Metab.*, **8** (2011) 21-24.
24. Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S.C., Wang, X., Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **65** (2013) 457-470.
25. Andričić, B., *Prirodni polimerni materijali, priručnik*, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2009., str. 33.
26. <http://www.cirkon.co.rs/svileni-saten.php> (pristup 15. lipnja 2017.)
27. <https://phys.org/news/2015-04-silk-cultivate-tissues-lab.html> (pristup 15. lipnja 2017.)
28. Swatantra, K.S., Awani, K.R., Satyawar, S., Chitosan: A platform for targeted drug delivery, *Int. J. Pharm. Techn. Res.*, **4** (2010) 2271-2282.

29. Rodriguez-Vazquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zuniga, R., Saldana-Koppel, A., Quinones-Olvera, L.F., Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine, *Biomed Res. Int.*, 2015, 821279.
30. Babić, B., Jovanovac, T., Jurec, Z., Kerec, M., Leko, H., Radas, P., Individualizirana biorazgradiva mrežica za augmentaciju alveolarnog koštanog nastavka, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu 2016.
31. Joshi, V.S., Lei, N.Y., Walthers, C.M., Wu, B., Dunn, J.C.Y., Macroporosity enhances vascularization of electrospun scaffolds, *J. Surg. Res.*, **183** (2013) 18-26.
32. Rnjak-Kovacina, J., Wise, S.G., Li, Z., Maitz, P.K.M., Young, C.J., Wang, Y., Weiss, A.S., Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering, *Biomaterials*, **32** (2011) 6792-6736.
33. Subhani, A.U.H., Influence of the Processes Parameters on the Properties of The Polylactides Based Bio and Eco-Materials, Doktorski rad, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP), 2011., str. 31.
34. Loh, Q.L., Choong C., Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size, *Tissue Eng. Part B Rev.*, **19** (2013) 485-502.
35. Zaiss, S., Brown, T.D., Reichert, J.D., Berner, A.; Poly (ϵ -caprolactone) Scaffolds Fabricated by Melt electrospinning for Bone Tissue Engineering, *Materials*, **9** (2016) 232.
36. Good, R.J., Contact Angle Wettability and Adhesion (Ed. K. L. Mittal), VSP, Utrecht (1993).
37. Bürgler, R., Samoorganizirajući monoslojevi i vodljivi polimeri kao zaštita čelika od korozije, Doktorski rad, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu, 2006., str. 76.
38. Arabi, A., Boggs, E., Patel, M., Surface Modification of Electrospun PCL Fibers for Enhances Cell Adhesion and Proliferation, Lawrence Technological University Biomedical Engineering Department 2012.
39. S. Brunauer, S., Deming, L.S., Deming, W.E., Teller, E., On a theory of the van der Waals adsorption of gases, *J. Am. Chem. Soc.* **62** (1940) 1723–1732.

40. Pena, J., Corrales, T., Izquierdo-Barba, I., Doadrio, A.L., Vallet-Regi, M., Long term degradation of poly (ϵ -caprolactone) films in biologically related fluids, *Polym.Degrad.Stab.*, **91** (2006) 1424-1432.

ŽIVOTOPIS

████████████████████ Osnovnu školu „Žepče“ i Opću gimnaziju KŠC „Don Bosco“ pohađala sam i završila 2011. godine u Žepču. Iste godine upisala sam sveučilišni preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Završni rad pod nazivom *Oksidacijska desulfurizacija dizelskog goriva s adsorpcijom* izradila sam pod mentorstvom prof. dr.sc. Katice Sertić-Bionda. Po završetku preddiplomskog studija 2015. godine obrazovanje nastavljam na sveučilišnom diplomskom studiju Ekoinženjerstva. U 2016. godini sudjelovala sam na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera.