

Toplinska svojstva elektroispređenih nosača na osnovi polikaprolaktona i fibroina

Lukić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:048168>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Iva Lukić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Iva Lukić

**Toplinska svojstva elektroispređenih nosača na
osnovi polikaprolaktona i fibroina**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: **prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić, FKIT**

Članovi ispitnog povjerenstva:

Emi Govorčin Bajsić, prof.dr.sc., FKIT

Budimir Mijović, prof. dr. sc., TTF

Zlata Hrnjak Murgić, prof.dr.sc., FKIT

Zagreb, srpanj 2018.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Emi Govorčin Bajsić na predloženoj temi, na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada.

Dr.sc. Budimiru Mijoviću na ustupanju uređaja potrebnog za provedbu elektropredenja i dr.sc. Emiliji Zdravevi na pomoći pri provedi eksperimentalnog dijela.

Hvala mojim prijateljima i prijateljicama, a posebno mom dečku Robertu i prijateljici Mateji na nesebičnom razumijevanju i podršci, bez vas ove godine studiranja ne bi prošle ovako brzo, zanimljivo, ni lako.

Najveća hvala mojoj obitelji na pruženoj podršci tijekom svih ovih godina studiranja, bez kojih sve ovo što sam postigla ne bi bilo moguće.

Velika HVALA svima!

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

Postupak elektroispredanja proveden je na Zavodu za temeljne prirodne i tehničke znanosti, Laboratorij za elektroispredanje, na Tekstilno-tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

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

SAŽETAK

Fibroin svile stoljećima se koristi u tekstilnoj industriji kao vlakno te već desetljećima u biomedicinske svrhe kao kirurški materijal za šivanje. Zbog svojih dobrih mehaničkih svojstava, biokompatibilnosti i biorazgradljivosti dalje se razvija njegova primjena u različite svrhe. U ovom radu pripremljeni su elektroispredeni nosači na osnovi polikaprolaktona (PCL) i fibrona svile (FS) postupkom elektroispredanja. Istražen je utjecaj FS na morfološku strukturu, kemijski sastav, toplinska svojstva, toplinsku stabilnost i hidrofobnost elektroispredanih PCL/FS vlaknastih nosača SEM analizom, infracrvenom spektroskopijom (FTIR), diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC), termogravimetrijskom analizom (TGA) te određivanjem kontaktnog kuta. Postupkom elektroispredanja dobivena je jednolična struktura PCL/FS vlaknastog nosača s tanjim promjerom vlakana i homogenom raspodjelom SF unutar vlakana. Dobiveni rezultati FTIR analize pokazuju da je fibroin svile uspješno ugrađen u elektroispredeni PCL vlaknasti nosač. Dodatkom FS povećala se hidrofilnost elektroispredanog PCL vlaknastog nosača. Rezultati dobiveni DSC tehnikom pokazali su da se dodatkom fibrona svile temperatura staklastog prijalaza povećava, dok se talište i stupanj kristalnosti smanjuje, zbog nastajanja slabije uređene kristalne strukture nastale dodatkom fibrona svile. Toplinska stabilnost određena je termogravimetrijskom analizom iz koje se vidi da se dodatkom fibrona svile smanjuje toplinska stabilnost.

Ključne riječi: elektroispredanje, polikaprolakton, fibroin svile, vlaknasti nosači, tkivno inženjerstvo

ABSTRACT

For centuries silk fibroin has been used as a textile fiber. Beyond textiles, silk fibroin has also been used in biomedical applications as a surgical material for decades. Because of his good mechanical properties, biocompatibility and biodegradability silk fibroin is being further developed for various emerging. In this work, electrospun scaffolds composed of polycaprolactone (PCL) and silk fibroin (SF) were prepared by electrospinning technique. Morphology, chemical composition, thermal properties, thermal stability and hydrofobicity of the PCL/SF scaffolds were characterized to evaluate the effect of SF by means of scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectra (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA) and contact angle. Electrospinning resulted in uniform fiber morphology with thinner fibers in PCL/SF scaffolds and a homogeneous SF distribution throughout the fibers. The FTIR results showed that the silk fibroin was successfully introduced to PCL scaffolds. The hydrophilicity of PCL modified scaffolds were enhanced. Results obtained with DSC showed that with addition of silk fibroin, glass transition temperature increases, while melting temperature and degree of crystallinity decreases, because of the less organized crystal structure with addition of silk fibroin. Thermal stability is determined by TGA which shows that with addition of silk fibroin thermal stability decreased.

Keywords : Electrospinning, Poly(ϵ -caprolactone),Silk Fibroin, Scaffold, Tissue engineering

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. Polikaprolakton..... | 2 |
| 2.2. Elektroispredanje | 3 |
| 2.2.1. Princip elektroispredanja..... | 3 |
| 2.2.2. Parametri procesa elektroispredanja..... | 4 |
| 2.2.3. Primjena procesa elektroispredanja..... | 7 |
| 2.3. Svila | 7 |
| 2.3.1. Svila kao biomaterijal..... | 7 |
| 2.3.2. Elektroispredanje fibroina svile | 10 |
| 2.3.3. Razgradnja fibroina svile | 10 |
| 2.3.4. Primjena svile u tkivnom inženjerstvu | 11 |
| 2.4. Tkivno inženjerstvo | 11 |
| 2.5. 3D printanje | 13 |
| 2.6. Tehnike za karakterizaciju | 14 |
| 2.6.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) | 14 |
| 2.6.2. Termogravimetrijska analiza (TGA) | 14 |
| 2.6.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) | 15 |
| 2.6.4. Infracrvena spektroskopija s Furierovom transformacijom signala (FT-IR) | 15 |
| 2.6.5. Goniometrija – mjerenje kontaktnog kuta s vodom | 16 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 17 |
| 3.1. Materijali | 17 |
| 3.2. Priprema polimerne otopine i fibroina za postupak elektroispredanja | 17 |
| 3.3. Postupak elektroispredanja | 17 |
| 3.4. Eksperimen | |

| | |
|--|----|
| talne tehnike korištene za karakterizaciju..... | 19 |
| 3.4.1. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) | 19 |
| 3.4.2. Infracrvena spektroskopija FTIR-ATR | 19 |
| 3.4.3. Mjerenje kontaktnog kuta s vodom | 20 |
| 3.4.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) | 20 |
| 3.4.5. Termogravimetrijska analiza (TGA) | 21 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 22 |
| 4.1. Određivanje morfologije elektroispredenih PCL/SF vlaknastih matova elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM)..... | 22 |
| 4.2. Rezultati dobiveni FTIR spektroskopijom | 25 |
| 4.3. Rezultati dobiveni mjerenjem kontaktnog kuta s vodom | 28 |
| 4.4. Rezultati dobiveni diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC)..... | 30 |
| 4.5. Rezultati dobiveni termogravimetrijom (TGA)..... | 33 |
| 5. ZAKLJUČAK | 36 |
| 6. LITERATURA | 37 |

1. UVOD

Svila je proteinski polimer, koji se nalazi u žlijezdama člankonožaca kao što su dudov svilac, pauk, škorpion, grinje i pčele. Sastav, struktura i svojstva svile mijenjaju se ovisno o izvoru iz kojeg se svila dobiva [1,2]. Zadnjih godina svila dudovog svilca zauzima veliku pozornost zbog njene biokompatibilnosti, dobrih mehaničkih svojstava, jednostavnosti obrade i njezine dostupnosti [1-4]. Odlike svila dudovog svilca su mekoća, biserni sjaj i dobra mehanička svojstva [3,5]. Svila se sastoji od dva proteina: fibroina svile i sericina. Sericin je poput lijepila omotan oko fibroina, topljiv je i može se odstraniti termo-kemijskom obradom, poznatom kao degumiranje [2,6]. Fibroin svile, prirodni fibroinski protein, je biomaterijal koji pokazuje bolju kompatibilnost nego neki često korišteni biološki polimeri kao što su kolagen i PLA [7]. Primjena fibroina svile kao biomaterijala započela je već u ranijim stoljećima, u medicini, kao šavovi za šivanje otvorenih rana [2,8]. Zbog svojih dobrih karakteristika biomaterijali na osnovi fibroina svile imaju primjenu i u dostavi lijekova [9], regeneraciji krvožilnog tkiva [10] i kože [11] te u skeletima koštanog tkiva [12]. Prirodni i sintetski polimeri koriste se kao biomaterijali u inženjerstvu tkiva. Sintetski polimeri dobivaju se jednostavnim procesima, međutim prirodni polimeri posjeduju bolju biokompatibilnost [13]. Biomaterijali za primjenu u inženjerstvu tkiva moraju imati sljedeća svojstva: (1) odličnu biokompatibilnost in vivo, (2) optimalna fizikalna svojstva, (3) karakterističnu topografiju i morfološka svojstva, (4) razgradnju na ne štetne nusprodukte i (5) kontrolu difuzivnosti [14]. Površinska topografija i mikro/nanostruktura biomaterijala igraju važnu ulogu u staničnom ponašanju. Mikro i nanostruktura biomaterijala imaju utjecaj na oblik i migraciju stanica te razdvajanje od matičnih stanica [15,16]. Obradom, fibroin svile može postići mikro i makro veličinu. Posljednjih desetljeća znanstvena istraživanja usmjerena su na razvoj strukture i svojstava bioloških materijala [17]. Biomaterijali na osnovi fibroina svile imaju strukturu vlakana, filma i 3D poroznu strukturu. Mnogi živi organizmi iz prirode zbog svoje višeslojne površinske strukture imaju višenamjenska svojstva. Na temelju prirodnih zakonitosti dolazi do razvoja biomaterijala na osnovi fibroina svile s biomimetičkom višeslojnom strukturom za raznu biološku primjenu.

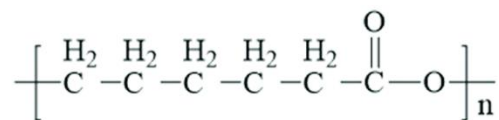
U ovom radu pripremljeni su vlaknasti porozni nosači na osnovi polikaprolaktona (PCL) i fibroina svile (FS) postupkom elektroispredanja. Istražen je utjecaj udjela PCL i FS na morfološki i toplinska svojstva PCL/FS vlaknastih nosača.

2. TEORIJSKI DIO

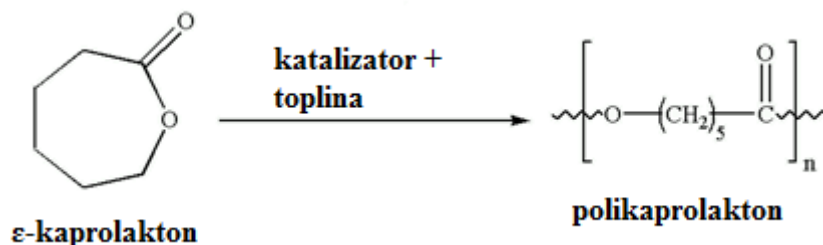
Teorijski dio uključuje opis materijala korištenih u radu te opis procesa elektroispredanja i parametara elektroispredanja koji utječu na morfologiju i promjere elektroispredanih vlakana. Opisana je primjena elektroispredanja s naglaskom na tkivno inženjerstvo. Na kraju poglavlja opisan je postupak 3D printanja kao postupka za dobivanje kolektora s određenom topografijom na kojima se vrši elektroispredanje nosača te su opisane tehnike koje se koriste za karakterizaciju materijala.

2.1. Polikaprolakton

Polikaprolakton (PCL) (slika 1) je polukristalni linearni polimer dobiven polimerizacijom otvaranjem prstena ϵ -kaprolaktona u prisutnosti kositrenog oktoata kao katalizatora (slika 2). PCL ima temperatura staklastog prijelaza oko $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, a temperaturu taljenja od $60 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri sobnoj temperaturi PCL ima prekidnu čvrstoću od 23 MPa i prekidno istezanje više od 700% . Zahvaljujući niskoj temperaturi staklastog prijelaza PCL se često koristi kao kompatibilizator i kao meki segment u poliuretanskim materijalima. PCL se lako razgrađuje uz pomoć mikroorganizama [18]. Za biorazgradnju PCL-a potrebno je nekoliko mjeseci do nekoliko godina, ovisno o molekularnoj masi, stupanju kristalnosti i uvjetima razgradnje [19].



Slika 1. Strukturna formula polikaprolaktona



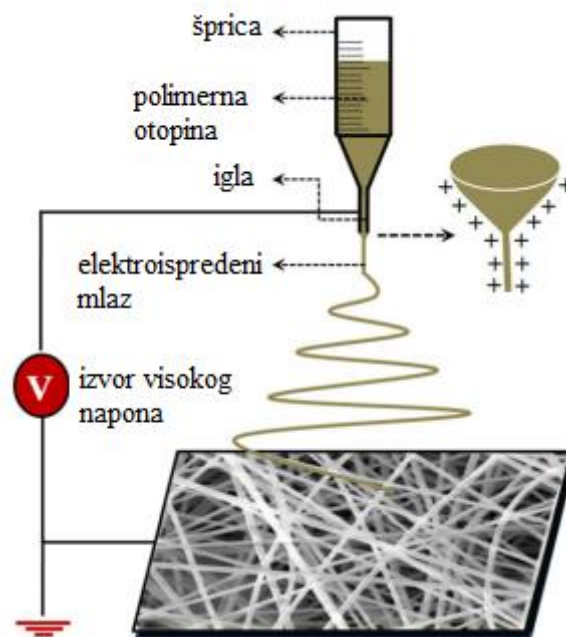
Slika 2. Dobivanje polikaprolaktona

PCL se koristi u različitim područjima primjene kao što su inženjerstvo tkiva, mikroelektronika te kao ljepila, u ambalaži itd. Njegova dobra svojstva kao što su kontrolirana razgradljivost, mješljivost s drugim polimerima i biokompatibilnost čine PCL primjenjivim u različitim područjima ukoliko postoji mogućnost kontroliranja njegovih svojstava [19].

2.2. Elektroispredanje

2.2.1. Princip elektroispredanja

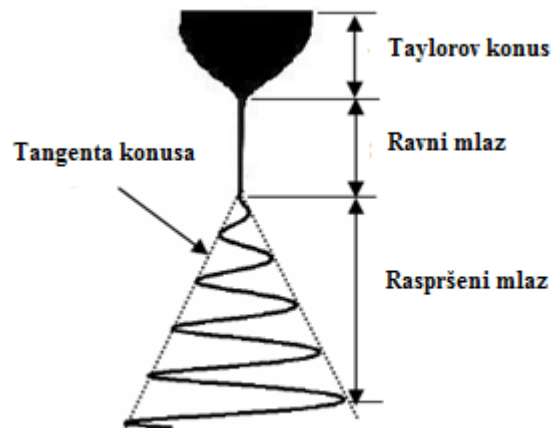
Elektropredanje je postupak proizvodnje nanovlakana iz mlaza polimerne otopine u elektrostatičkom polju [20]. Osnovna izvedba uređaja za elektroispredanje uključuje: posudu s polimernom otopinom (najčešće šprica), mlaznicu (najčešće igla ravnog vrha) povezanu s izvorom visokog napona i kolektor vlakana povezan s drugim polom električnog polja (slika 3) [21].



Slika 3. Osnovna izvedba uređaja za elektroispredanje [22]

Sam proces elektroispredanja odvija se uvođenjem mlaza polimerne otopine u električno polje visokoga napona. Jedna se visoko naponska elektroda priključi na kapilarni uređaj za elektroispredanje, dok se druga elektroda priključi na zaslon za prikupljanje vlakana –

kolektor. [20] Kada se polimerna otopina podvrgne djelovanju električnog polja dolazi do formiranja kapljice na vrhu igle i nakupljanja naboja. Prilikom elektroispredanja, snaga električnog polja savlada kohezivnu silu otopine te dolazi do istezanja kapljice i nastanka mlaza polimerne otopine koji putuje prema kolektoru [23]. Kapljica se isteže u konusnom obliku, koji se naziva Taylorov konus (slika 4) [24]. Gibanjem električki nabijenog mlaza prema kolektoru dolazi do ispravanja otapala i oblikovanja suhih vlakana [21].



Slika 4. Ponašanje elektroispredenog mlaza [25]

Zapažno je da su promjeri tako načinjenih vlakana višestruko manjega promjera nego li uobičajena vlakna. Tvorevine nastale elektroispredanjem zbog smanjenih dimenzija posjeduju posebnu mikrostrukturu, a time i specifična uporabna svojstva. Postupak elektroispredanja razvijen je u posljednjih nekoliko godina, a uključuje obilje polimernih materijala, biomaterijala i nekih vrsta metala [20].

2.2.2. Parametri procesa elektroispredanja

Veličina i površinska morfologija vlakana ovise o parametrima elektroispredanja [26]. Ti parametri dijele se u tri skupine: parametri otopine, procesni parametri i parametri okoline.

2.2.2.1. Parametri otopine

Koncentracija polimernih otopina imaju važnu ulogu u formiranju vlakana tijekom procesa elektroispredanja. Pri niskim koncentracijama neće doći do elektroispredanja, već do

elektroaspršenja pri čemu se dobiva zrnata morfologija vlakna. Razlog tome je mala viskoznost i velika površinska napetost otopine. S povećanjem koncentracije dolazi do nastanka mješavine zrnate morfologije i nanovlakana, dok se samo pri postizanju optimalne koncentracije dobivaju glatka vlakna. Ukoliko je koncentracija jako visoka dobit će se mikro vrpce u obliku spirala. Također, povećanjem koncentracije otopine, promjer vlakana se povećava ukoliko je koncentracija otopine prikladna za elektroispradanje, dok se viskoznost otopine može regulirati prilagođavanjem koncentracije otopine.

Molekulska masa polimera također ima važan utjecaj na morfologiju elektroispređenog vlakna. Molekulska masa je odraz isprepletenosti u polimernim lancima tj. viskoznosti. Pri konstantnoj koncentraciji, polimeri male molekulske mase imaju tendenciju stvaranja zrnate morfologije. Povećanjem molekulske mase polimera dobivaju se glatka nanovlakna. Daljnjim povećanjem molekulske mase, čak i pri niskim koncentracijama otopine polimera dobivaju se mikro vrpce. Međutim, uočeno je da molekulska masa neće značajno utjecati na elektroispradanje ukoliko dolazi do intermolekularnih interakcija koje bi zamjenile isprepletenost.

Viskoznost otopine je ključni parametar u određivanju morfologije vlakana. Dokazano je da kontinuirana i glatka vlakna ne mogu biti dobivena pri jako niskoj viskoznosti, dok vrlo visoka viskoznost rezultira teškim izbacivanjem mlaza iz mlaznice te je nužno naći optimalnu viskoznost pri kojoj bi došlo do procesa elektroispređanja. Viskoznost otopine može se regulirati podešavanjem koncentracije polimera. Važno je naglasiti da su viskoznost, koncentracija polimera i molekulska masa polimera međusobno povezani. Za otopinu niske viskoznosti bitan čimbenik je površinska napetost pri čemu dolazi do nastanka zrnate strukture. Kako bi se dobila kontinuirana vlakna, koncentracija polimerne otopine mora biti iznad kritične, uz optimalnu viskoznost. Možemo zaključiti da za svaki polimer postoje određene vrijednosti optimalne viskoznosti pri kojima nastaju kontinuirana vlakna.

Površinska napetost ovisi o sustavu otapala koja se koriste. Uočeno je da različita otapala mogu doprinijeti različitim površinskim napetostima. S konstantnom koncentracijom, smanjenjem površinske napetosti otopine, iz zrnate strukture mogu nastati glatka neprekidna vlakna. Također, površinska napetost i viskoznost otopine se mogu podesiti mijenjanjem masenog omjera između smjese otapala i morfologije vlakna.

Konduktivnost (specifična električna provodnost) polimerne otopine određuje vrsta polimera, otapalo i ionizirajuće soli. Prirodni polimeri su uglavnom polielektroliti u kojima

ioni povećavaju kapacitet mlaza što dovodi do veće napetosti u električnom polju te rezultira lošom formiranjem vlakana u odnosu na sintetski polimer. Također, električna konduktivnost otopine može biti regulirana dodavanjem ionskih soli kao što su KH_2PO_4 , NaCl itd.. Pomoću ionskih soli dobivaju se nanovlakna relativno malog promjera. Ponekad se velika konduktivnost otopine može postići korištenjem organskih kiselina. Iz dosadašnjih istraživanja uočeno je da se povećanjem konduktivnosti polimerne otopine smanjuje promjer nastalih vlakana.

2.2.2.2. Procesni parametri

Električni napon ključan je parametar tijekom procesa elektroispredanja. Veći naponi mogu povećati elektrostatsku odbojnu silu napunjenog mlaza pri čemu nastaju vlakna malog promjera te je veća vjerojatnost da će doći do nastanka zrnate strukture nego do formiranja neprekidnih glatkih vlakana. Može se zaključiti da električni napon u ovisnosti o koncentraciji polimerne otopine i udaljenosti između mlaznice i kolektora elektroispredanih vlakana utječe na promjer vlakana.

Protok otopine polimera unutar šprice je još jedan značajan procesni parametar koji utječe na proces elektroispredanja. Manji protok je povoljniji jer će otopina polimera dobiti dovoljno vremena za polarizaciju. Pri velikim protocima dolazi do nastanka zrnate strukture velikih promjera, uz nastanak kapljica na elektroispredanom materijalu zbog nedovoljnog vremena za sušenje prije dolaska na kolektor.

Kolektori se tijekom procesa elektroispredanja ponašaju kao konduktivni supstrat na kojima se priklupljaju nabijena vlakna. Uglavnom se kao kolektor koristi aluminijska folija, no zbog teškoće prikupljena nanovlakana koriste se i drugi materijali. Kako bi se olakšao prijenos vlakana napravljeni su kolektori koji uključuju žičanu mrežu, iglu, rešetke, paralelnu šipku, rotirajući kotač, itd.

Udaljenost (H) između kolektora i vrha šprice također može utjecati na promjer i morfologiju vlakana. Ako je udaljenost premala, vlakna neće imati dovoljno vremena da očvrstnu prije nego dođu do kolektora. Međutim, ako je udaljenost prevelika može doći do nastanka zrnate strukture. Također, sa smanjenjem razmaka dolazi do nastanka ravnijih vlakana, a povećanjem razmaka nastaju sferičnija vlakna.

2.2.2.3. Okolni parametri

Okolni uvjeti poput temperature i vlažnosti utječu na promjer i morfologiju vlakana. Povećana temperatura pogoduje nastajanju vlakana manjih promjera. Niska vlažnost može osušiti otapalo do kraja i povećati brzinu isparavanja otapala. Nasuprot tomu, visoka vlažnost će dovesti do nastanka vlakana većih promjera, jer dolazi do smanjenja sila istezanja [27].

2.2.3. Primjena procesa elektroispradanja

Procesom elektropredenja mogu se dobiti kombinacije materijala koje nije moguće načiniti drugim postupcima [20]. Zbog svojih jedinstvenih svojstava elektroispredeni materijali nalaze potencijalnu primjenu u mnogim područjima poput: pohrane energije, senzora, filtracije, katalizatora, zaštitnih tekstilija, tkivnog inženjerstva, prijenosa i oslobađanja lijekova, bioloških komponenti i sl. [21].

Procesom elektropredenja mogu se proizvesti vlakna od mikro do nano veličine te vlakna visoke poroznosti slične prirodnom izvanstaničnom matriksu - ECM. Elektroispredati se mogu različiti materijali: biorazgradljivi, nerazgradljivi i prirodni materijali. Elektroispredena vlakna mogu biti usmjerena ili nasumično raspoređena. U elektroispredenu vlaknastu strukturu mogu se ugraditi različiti lijekovi (antibiotici, antikarcinomske supstance, proteini, DNA i RNA). Velike površine unutrašnjosti prema volumenu elektroispredene vlaknaste strukture mogu poboljšati povezanost stanica, količine lijeka i svojstva prijenosa.

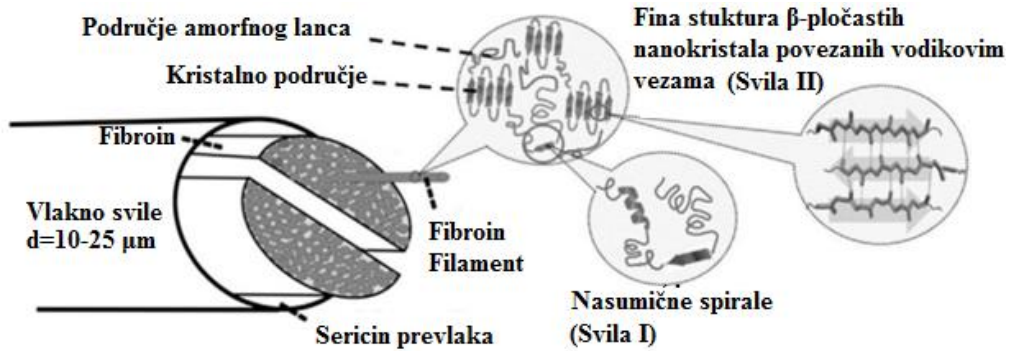
Primjena elektropredenja u tkivnom inženjerstvu i prijenosu te oslobađanju lijekova su gotovo neograničene [28].

2.3. Svila

2.3.1. Svila kao biomaterijal

Fibroin svile je prirodni polimer koji se koristi u tekstilnoj industriji već stoljećima. Svila dudovog svilca sastoji se od dva primarna proteina; fibroina svile (otprilike 75%) i sericina (25%) (slika 5 i 6) [29]. U sirovoj svili, sericin je pozicioniran preko površine dvaju paralelnih fibroinskih vlakana, tako ih spajajući. Fibroin svile je fibrozni protein s polukristalnom strukturom koja pruža krutost i čvrstoću. Sericin je amorfni protein sličan ljepilu koji se

ponaša kao vezivo da bi zadržao strukturni integritet vlakana. Sericin je topljiv i može se ukloniti termokemijskim postupkom poznatim kao degumiranje [30].

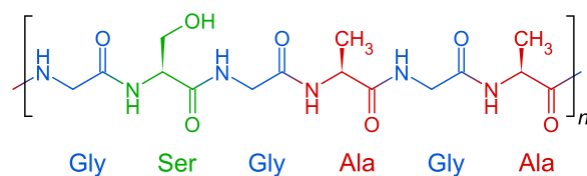


Slika 5. Shematski prikaz strukture fibroina svile, d je promjer vlakna svile



Slika 6. SEM mikrografija svilenkastog fibroina svile koji je prekriven sericinom

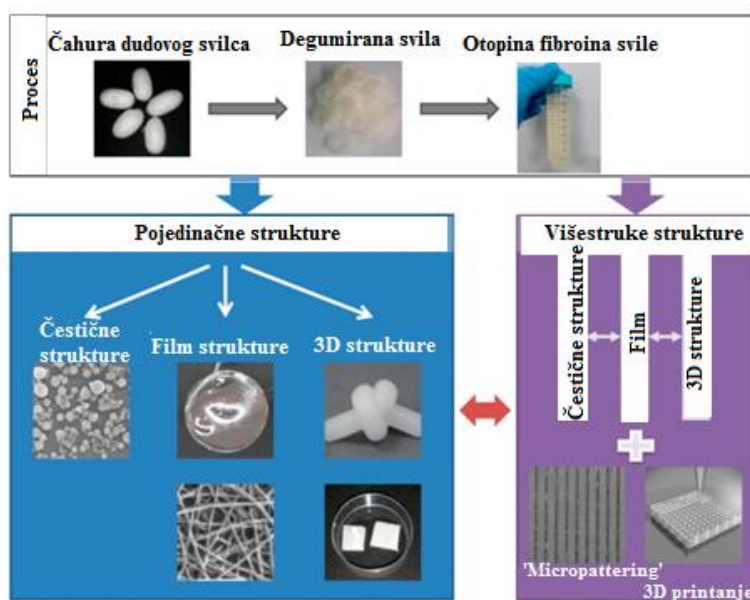
Fibroin svile iz dudovog svilca je po sastavu aminokiselina sastavljena od Gly (43%), Ala (30%) i Ser (12%) (Slika 7).



Slika 7. Primarna struktura fibroina

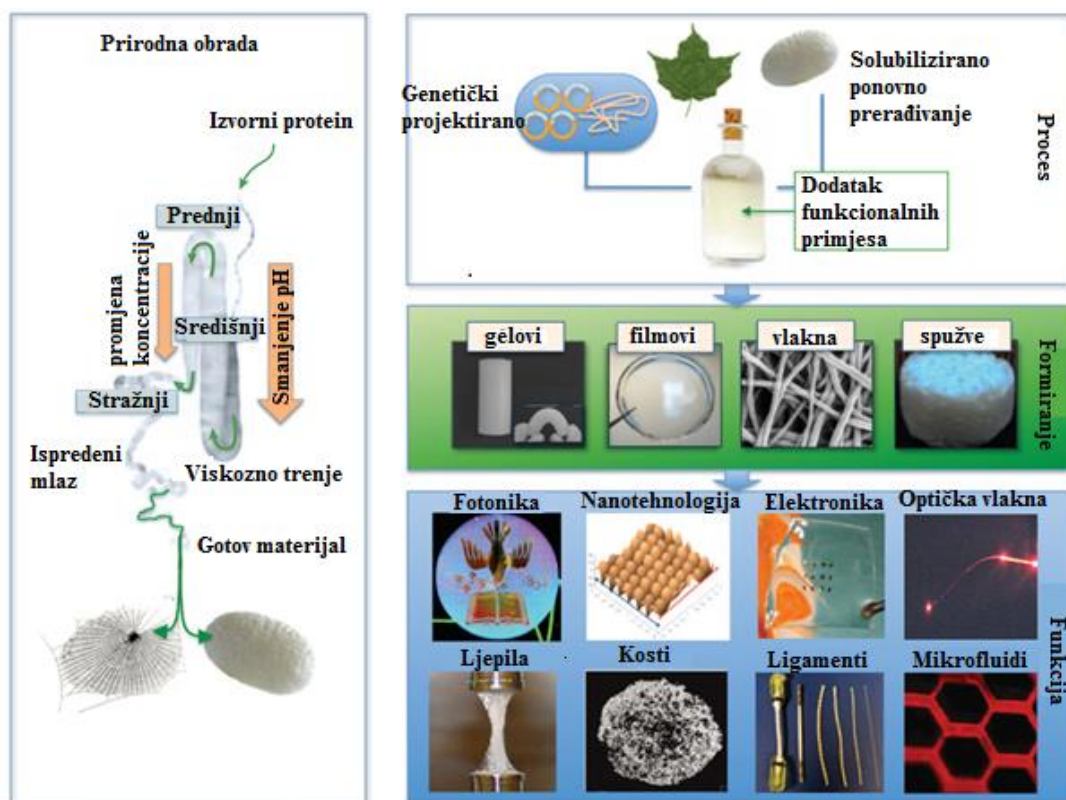
Hidrofobno područje vodikovog lanca sadrži ponavljajuće sekvence heksapeptida Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser i ponavljajućih Gly-Ala/Ser/Tyr dipeptida, koji mogu formirati stabilne anti paralelne β-pločaste kristalite. Amino kiselina sekvenca L- lanca je neponavljajuća tako da je L-

lanac hidrofilniji i relativno elastičan [31-34]. Kristalna struktura fibroina svile iz dudovog svilca je svila I i svila II. Svila I je metastabilna struktura poput poluge ili S cik-cak strukturne prostorne konformacije, a pripada ortorombskom sustavu. Svila II je antiparalelna β -pločasta struktura te pripada monoklinskom sustavu. Jake vodikove veze između susjednih segmenata puno doprinose krutosti i prekidnoj čvrstoći fibroina svile [35]. Struktura svile I može biti jednostavno prevedena u svilu II obradom s metanolom ili kalijevim fosfatom [36,37]. Kako fibroin svile posjeduje odličnu preradljivost, razni oblici biomaterijala na osnovi fibroina svile mogu se proizvesti raznim metoda obrade. Da bi se dobila regenerirana vodena otopina fibroina svile dudovog svilca, svila se prerađuje u sljedećim koracima (slika 8): degumiranje, otapanje degumiranih vlakana svile u visoko molarnoj kaotropnoj solnoj otopini kao što je LiBr i ionske tekućine. Soli se uklanjaju dijalizom [38,39].



Slika 8. Struktura biomaterijala na bazi fibroina svile [40,41]

U zadnjem desetljeću dolazi do značajnog razvoja novih materijala od svile i njihove primjene u različitim područjima uključujući i medicinu (slika 9) [42]. Na lijevoj strani slike 9 prikazana je prerada svile od njezine sinteze, skladištenja do elektroispredanja. Analogni procesi dobivanja novih materijala prikazani su na desnoj strani, ali uz korištenje proteina svile ili genetički dobivene svile. Ovi materijali razlikuju se po mehaničkim svojstvima, morfologiji i strukturi. Navedenim postupcima prerade svile dobivaju se hidrogelovi, vlakna, spužve i filmovi koji nalaze svoju primjenu u elektronici, medicini i drugim područjima.



Slika 9. Izrada novih materijala iz prirodne svile [42]

2.3.2. Elektroispredanje fibroina svile

Fibroin svile prvi je put elektroispredan iz HFIP-a (heksafluoro-2-propanola) u Zagrebu 1998. i patentiran 2000. godine. Uočeno je da je koncentracija fibroina svile odigrala ključnu ulogu u proizvodnji elektroispredanih vlakana. 2002. godine uspješno je proveden proces elektroispredanja fibroina svile iz vodene otopine. To je postignuto dodavanjem polietilen oksida (PEO) u otopinu svile kako bi se povećala viskoznost. Međutim daljnje studije, ukazivale su na ostatak PEO u vlaknastog nosaču ('scaffold') što je smanjilo vezivanje stanica i proliferaciju te je nepovoljno utjecalo na mehanička svojstva vlaknastog nosača. Regenerirani fibroin svile elektroispreda se kao i bilo koja druga zavojito spiralna ('coil') struktura, dok su tzv. β -ploče dobivene dodatkom agensa kao što je metanol.

2.3.3. Razgradnja fibroina svile

Prema dosadašnjim istraživanjima zaključeno je da biomaterijali gube veći dio svoje prekidne čvrstoće nakon 60 dana implantacije in vivo [43]. Prema tome, fibroini svile se klasificiraju kao nerazgradljivi materijali, jer zadržavaju više od 50% svojih mehaničkih svojstava nakon dva mjeseca implantacije in vivo.[3] Ipak će tijekom dužeg vremena (unutar dvije godine)

doći do njihove potpune razgradnje [43]. Razgradnja biomaterijala je važna u smislu obnove pune strukture tkiva i funkcija tkiva koji su implementirani u organizam in vivo. Bitno je kontrolirati brzinu razgradnje tako da brzina razgradnje kalupa odgovara stopi rasta tkiva. [3] Brzina razgradnje će ovisi o mjestu implementacije. Svila se smatra biorazgradivom zbog svoje mogućnosti razgradnje uz pomoć bakterija i enzima. Također, na razgradnju fibroina svile može utjecati i otapalo koje se koristi za proces elektroispredanja. Dokazano je da se upotrebnom vodene otopine, umjesto organskog otapala poput HFIP-a može povećati brzina razgradnje. Uz fibroin svile, postoji širok raspon biopolimera koji se mogu koristiti za tkivno inženjerstvo no njihovo vrijeme razgradnje je mnogo kraće pa se zbog toga rijede koriste. Tako se na primjer, kolagen kao biomaterijal razgrađuje tijekom 1-4 tjedna, dok polikaprolakton može ostati nerazgrađen tijekom više od dvije godine [3].

2.3.4. Primjena svile u tkivnom inženjerstvu

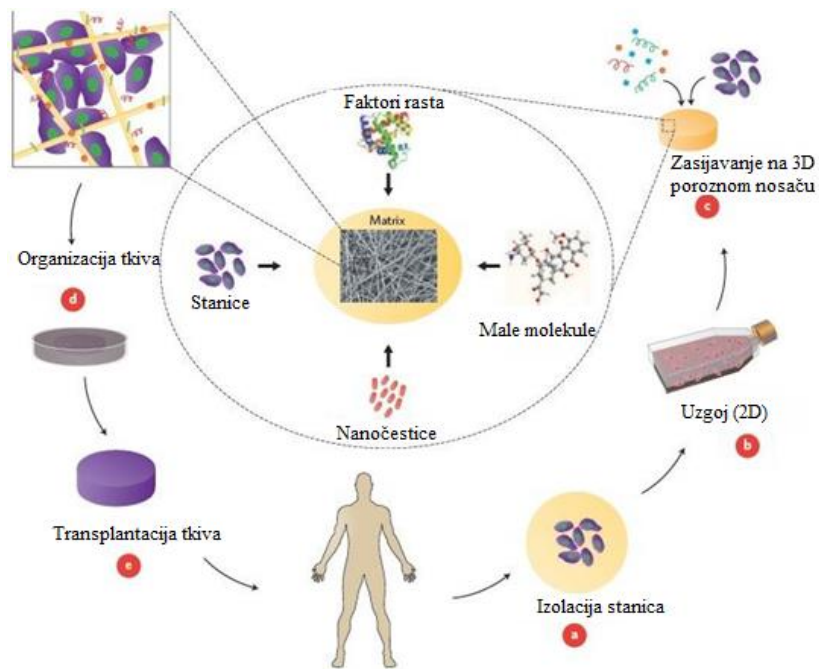
Fibroin svile važan je prirodni polimer za primjenu u tkivnom inženjerstvu zbog velike prekidne čvrstoće, biokompatibilnosti, slabog stupnja razgradnje, dobre propusnosti vodene pare i kisika te sposobnosti da se koristi u različitim oblicima. Osim toga, dobivena svilena vlakna su termički stabilna do 245 °C što osigurava njihovu stabilnost pri temperaturi tijela. Fibroin svile može se koristiti kod procesa elektroispredanja kao hidrogel ili film. Može se primijeniti za inženjerstvo koštanih tkiva, vaskularnih tkiva ili ligamenata [43].

2.4. Tkivno inženjerstvo

Tkivno inženjerstvo je interdisciplinarno područje u kojem se koriste najsuvremenija dostignuća iz područja genetike, stanične i molekularne biologije, biokemije, biomedicine te znanosti o materijalima. Izvedeni sintetski ili prirodni biomaterijali koriste se za zamjenu oštećenih ili neispravnih tkiva kao što su kost, hrskavice i koža, pa čak i organa. Tkivno inženjerstvo obuhvaća korištenje matičnih stanica tzv. nosača ('scaffold') koji predstavljaju privremenu strukturu na kojoj raste novo tkivo, koje na kraju zamjenjuje implantirani kalup. Ovi acelularni (bezstanični) nosači mogu se prilagoditi u laboratoriju kako bi pomogli u liječenju ciljanih zdravstvenih stanja i ozljeda koje su štetne za ljudsko zdravlje i oporavak pacijenta. Acelularni nosači mogu se proizvesti tehnikom elektroispredanja. Ova se metoda

može koristiti za prilagodbu različitih svojstava nosača kako bi bolje odgovarala zahtjevu za koji su namijenjeni [3].

Na slici 10 može se vidjeti primjer koncepta tkivnog inženjerstva koji uključuje zasijavanje stanica unutar poroznog nosača načinjenog od biomaterijala.



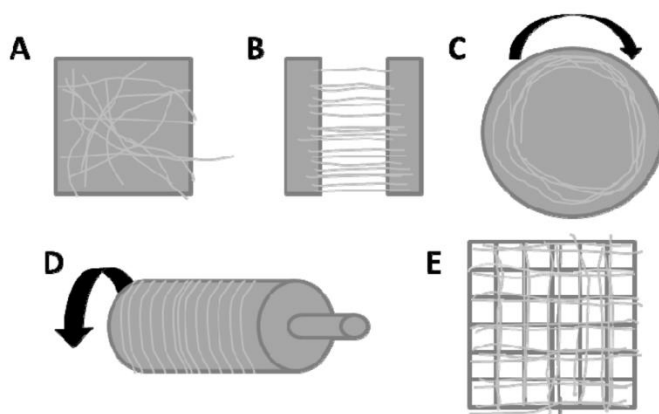
Slika 10. Primjer koncepta tkivnog inženjerstva koji uključuje zasijavanje stanica unutar poroznog nosača načinjenog od biomaterijala. (a) Stanice su izolirane iz pacijenta i spremne za uzgoj (b) *in vitro* na dvodimenzionalnoj površini kako bi se uspješnije razvile. (c) Stanice su zasijane na poroznom nosaču zajedno s faktorima rasta, malim molekulama i mikro/nano česticama. Nosači služe kao mehanička potpora i kalup te njihova poroznost osigurava visoki prijenos mase i uklanjanje otpada. (d) Konstruirane stanične strukture se dalje kultiviraju u bioreaktoru kako bi se osigurali optimalni uvjeti za organizaciju u funkcionalno tkivo. (e) Jednom kada se uspješno konstruira funkcionalno tkivo, konstrukcija se transplantira na ranu kako bi se povratila funkcija. [44]

2.5. 3D printanje

Elektroispredanje je uobičajena tehnika koja se koristi za izradu nanovlaknastih nosača za primjenu u tkivnom inženjerstvu. Elektroispredanje vlakana može se vršiti na različito dizajniranim kolektorima koji utječu na morfologiju vlakana dobivenih procesom elektroispredanja [45].

Oblik i sastav kolektora su najvažniji parametri procesa elektroispredanja koji utječu na morfologiju i orijentaciju nanovlakana. Postoje različiti tipovi kolektora kao što su statički kolektori (ploče, elektrode) i dinamički kolektori (rotirajući diskovi i bubnjevi) [46],

slika 11. Kontroliranjem elektrostatičkih sila putem posebno dizajniranog kolektora ili skupljanjem mlaza s elektroraspršivača na brzo rotirajući kolektor može se utjecati na raspored nanovlakna od nasumičnog rasporeda prema orijentiranom rasporedu, slika 11 [46]. Početni pokušaji razvoja kolektora bili su problematični i potom su potaknuli sve veći interes za 3D printanjem kao načinom za izradom kolektora. Koristeći tehnologije trodimenzionalnog printanja, mogu se proizvesti ECM-u slični kalupi s visokim stupnjem složenosti i preciznosti [47].



Slika 11. Položaj nanovlakana na određenom obliku kolektora: a) ploča, b) paralelne elektrode, c) rotirajući disk, d) rotirajuće vreteno, e) rešetka

Tijekom svoga rada znanstvenici su pronašli metodu za izradu 3D kolektora različitih geometrija pomoću brzog prototipnog postupka. Zatim su modelirali 3D sinusoidne PLGA elektroispredene kalupe s nasumičnim i orijentiranim rasporedom vlakana. Također, procijenili su utjecaj proizvedenih kalupa na 3T3 fibroblastima i proliferaciji in vitro. Uočili su da su fibroblasti pričvršćeni na poravnata PLGA mikrovlakana sinusoidnih oblika bez penetracije

stanica. Uz to, proučavan je i utjecaj rotacije igle prilikom procesa elektroispredanja. Uočeno je da je za postizanje maksimalne orijentacije nanovlakana, potrebna brzina od 1.000 do 2.500 o/min, uz održavanje ostalih parametara konstantnim, dok bi povećanje brzine iznad 2.000 o/min uzrokovalo lom nanovlakana. Dokazano je da izravnata elektroispredena nanovlakna mogu značajno utjecati na vezanje u stanici i proliferaciju u slučaju neuronskih stanica, u regeneracija živaca.

Iako se ovakvim metodama može kontrolirati proizvodnja i orijentacija nanovlakana, postoje i nedostaci kao što su dugo vrijeme potrebno za proizvodnju te nepreciznost metode. Zaključeno je da, kako bi se osigurala precizna i kontrolirana proizvodnja orijentiranih i nasumično raspoređenih nanovlakana na 3D kolektorima potrebno je kombinirati 3D printanje i proces elektroispredanja [46].

2.6. Tehnike za karakterizaciju

2.6.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) je toplinska tehnika koja mjeri toplinski tok povezan sa strukturom (amorfna ili kristalna) i strukturnim promjenama odnosno prijelazima materijala. Dakle, mjeri se apsorbirana (endotermna) ili otpuštena (ezgotermna) toplinska energija u funkciji temperature ili vremena. Ovom toplinskom tehnikom mogu se karakterizirati talište (T_m), kristalište (T_c), staklište (T_g), toplina taljenja ($\Delta H_m/Jg^{-1}$) i kristalizacije ($\Delta H_k/Jg^{-1}$), postotak kristalnosti ($\chi/\%$), toplinska stabilnost, kompatibilnost, razgradnja i očvršćivanje. Površina ispod pika proporcionalna je količini apsorbirane i utrošene energije. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) je najviše korištena toplinska tehnika toplinske analize te se koristi za karakterizaciju različitih kemijskih spojeva kao što su polimeri, organske i anorganske kemikalije, hrana, metali, farmaceutski spojevi itd.

2.6.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogravimetrijska analiza ili termogravimetrija (TGA) je toplinska tehnika koja mjeri promjenu mase uzorka u funkciji temperature ili vremena. Gubitak mase uzorka može biti uzrokovan raspadom ili oksidacijom uzorka. Termogravimetrijska analiza (TGA) ima široku primjenu no može se koristiti samo za uzorke koji podliježu promjeni mase. Koristi se za

identificiranje uzorka, ispitivanje stabilnosti organskih tvari, oksidacije metala, uvjeta razgradnje polimera, određivanje udjela vlage te hlapivih ili gorivih komponenti u uzorku itd.

2.6.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

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

2.6.4. Infracrvena spektroskopija s Furierovom transformacijom signala (FT-IR)

Infracrvena spektroskopija s Furierovom transformacijom signala temelji se na propuštanju infracrvenog zračenja kroz uzorak, pri čemu se dio zračenja apsorbira, a dio propušta, tj. transmitira. Dobiveni spektar je jedinstven i karakterističan za pojedini uzorak te prikazuje apsorpcijske vrpce koje odgovaraju frekvencijama vibracija veza između atoma ispitivanog uzorka. Osnovna karakteristika infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom signala (engl. Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR) je osjetljivost na funkcionalne skupine te se to svojstvo koristi za identifikaciju nepoznatog materijala, kvalitete ili izgleda uzorka i udjela komponente u smjesi. Funkcionalne skupine u molekuli zbog utjecaja infracrvenog zračenja vibriraju, rotiraju i dolaze u interakcije s drugim atomima molekule te na taj način daju jedinstveni, ali kompleksni IR spektar za svaku od tih skupina. U literaturi se mogu pronaći tablice karakterističnih apsorpcijskih linija za pojedine funkcionalne skupine, koje pomažu pri identifikaciji nepoznatog uzorka. U spektrometru izvor emitira infracrveno zračenje koje se fokusira na interferometar sačinjen od nekoliko dijelova: razlagača zraka i

dva zrcala od kojih je jedno pomično, a jedno nepomično. Emitirana zraka prolazi kroz uzorak, koji pri tome apsorbira neke frekvencije, a signal ulazi u detektor. Kao rezultat ponavljanja dobije se interferogram, koji se potom obrađuje algoritmom Fourierove transformacije signala te se dobiva FT-IR spektrogram.

2.6.5. Goniometrija – mjerenje kontaktnog kuta s vodom

Goniometrija je znanost koja se bavi mjerenjem i određivanjem kutova i njihovih funkcija. Goniometri su uređaji koji se koriste za mjerenje kontaktnih kuteva. Kontaktni kut (θ) je mjera kojom se opisuje kvaliteta močenja površine i definira se kao kut koji zatvara tangenta povučena na rub kapi tekućine koja se nalazi na nekoj čvrstoj površini iz trojne točke kontakta triju faza (krute, plinovite i tekuće). Iz kontaktnog kuta moguće je odrediti površinsku napetost te slobodnu površinsku energiju.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Postupak elektroispredanja proveden je na Zavodu za temeljne prirodne i tehničke znanosti, Laboratorij za elektroispredanje, na Tekstilno-tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

Ostale tehnike karakterizacije koje su dio ovog diplomskog rada: diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC), termogravimetrijska analiza (TGA), mjerenje kontaktnog kuta vode, pretražna elektronska mikroskopija (SEM), infracrvena spektroskopija s Furierovom transformacijom signala (FT-IR) provedene su na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.

Eksperimentalni dio podijeljen je u dva djela, u prvom dijelu opisan je način dobivanja elektroispredanih nosača i tehnike za njihovu karakterizaciju. Nakon čega slijedi objašnjenje dobivenih rezultata mjerenja s naglaskom na utjecaj udjela PCL i FS na morfološka i toplinska svojstva elektroispredanih PCL/SF vlaknastih nosača.

3.1. Materijali

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

Kod pripreme kolektora korišten je i grafitni sprej, Grafit, proizvođača CRC Industries Europe.

3.2. Priprema polimerne otopine i fibroina za postupak elektroispredanja

Pripremljene su različite koncentracije polimerne otopine PCL-a u rasponu od 10% - 18%. Omjer glacijalne octene kiseline i acetona iznosio je 8:2. Kako bi se postigla homogenost otopine korištena je magnetska miješalica. Naknadno je u polimernu otopinu dodan fibroin svile (50%) te su uzorci homogenizirani na magnetskoj miješalici.

3.3. Postupak elektroispredanja

Elektroispredanje pripremljenih otopina PCL-a i otopine PCL-a modificirane fibroinom svile provedeno je na uređaju za elektroispredanje, NT-ESS-300, NTSEE Co. Ltd. South Korea.

Uređaj za elektroispredanje se sastoji od: šprice s iglom ravnog vrha, izvora visokog napona, pumpe i kolektora, slika 12.

Uvjeti postupka elektroispredanja su:

Električni napon (U): 17-21 V

Udaljenost igle od kolektora (x): 18 cm

Brzina protjecanja polimera (v): 1 mL/h

Šprica proizvođača, BD plastic, puni se sa po 5 mL otopine PCL-a ili otopine PCL-a modificirane fibroinom svile. Šprica s iglom stavlja se na pumpu te se postavlja uvjet brzine protjecanja otopine. Na iglu se priključi izvor napona radi raspršenja polimerne otopine. 3D izrađeni kolektori postavljaju se na 18 cm od šprice s iglom te započinje elektroispredanje. Naprije se elektroispreda polimerna otopina PCL zadane koncentracije, nakon čega slijedi elektroispredanje polimerne otopine otopine PCL-a modificirane fibroinom svile na već elektroispredeni sloj te se stvara dvosloj. Nakon završetka elektroispredanja, isključuje se izvor napona te se elektroispredeni uzorak uklanja s kolektora i sprema za daljnju analizu.

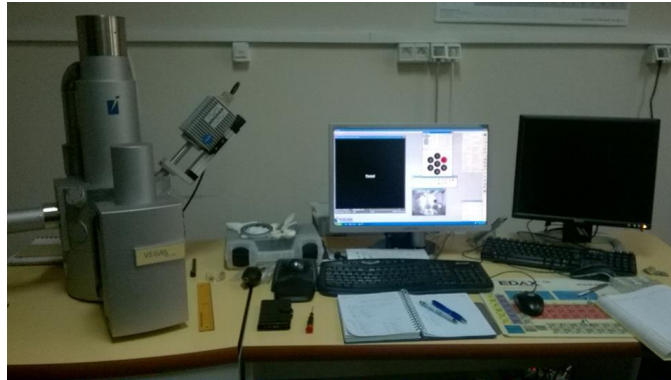


Slika 12. Uređaj za elektroispredanje na Tekstilno-tehnološkom fakultetu u Zagrebu.

3.4. Eksperimentalne tehnike korištene za karakterizaciju

3.4.1. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija elektroispredjenih PCL/FS vlaknatih nosača te izgled površine snimljeni su na pretražnom elektronskom mikroskopu Tescan VEGA 3 Brno, Češka, (slika 13) bez nanošenja sloja zlata. Uzorci su snimljeni uz uvećanje od 2000 puta.



Slika 13. Pretražni elektronski mikroskop (SEM) Tescan VEGA 3 Brno, Češka

3.4.2. Infracrvena spektroskopija FTIR-ATR

Promjene u strukturi polikaprolaktona dodatkom fibroina svile praćene su FTIR-ATR spektroskopijom na instrumentu FTIR Spectrum One, Perkin Elmer uz ATR komoru, koji je prikazan na slici 14.



Slika 14. Perkin Elmer, Spectrum One FTIR spektrometar

3.4.3. 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 15). Provedeno je mjerenje za nemodificirani PCL i PCL modificiran s fibroinom svile. Volumen kapljice vode koji je nanešen na uzorke varirao je od 1.000 μL do 5.000 μL . Na svaki je uzorak nanešeno 3 kapljice te je nakon 20 sekundi mjeren kontaktni kut.



Slika 15. Goniometar, DataPhysics OCA 20 Instrument

3.4.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Toplinska svojstva određena su na DSC instrumentu Mettler Toledo DSC 822e (slika 16) prema provedenoj metodi:

- hlađenje od 25°C do -100°C (brzina hlađenja 10°C/min)
- 2 min. na -100 °C
- zagrijavanje od -100°C do 80°C (brzina zagrijavanja 10°C/min)
- 5 min. na 80°C
- hlađenje od 80 °C do -100 °C (brzina hlađenja 10°C/min)
- zagrijavanje od -100°C do 80 °C (brzina zagrijavanja 10°C/min).

Masa uzoraka iznosila je oko 5 mg, mjerenja su provedena u atmosferi inertnog plina dušika (40 ml/min.), a hlađenje na niske temperature provedeno je tekućim dušikom. Iz drugog ciklusa hlađenja određena je temperatura kristalizacije (T_c) dok su iz drugog ciklusa zagrijavanja određene temperature staklastog prijelaza (T_g) i temperatura taljenja (T_m) kao i entalpije taljenja na osnovu kojih je izračunat stupanj kristalnosti (χ_c) primjenom izraza (1):

$$\chi_c (\%) = \frac{\Delta H_m^o}{\Delta H_m^{100}} * 100 \quad (1)$$



Slika 16. DSC analizator Mettler Toledo 822e

3.4.5. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Za određivanje toplinske stabilnosti korišten je TGA analizator Q500 tvrtke TA Instruments, slika 17. Uzorci od oko 10 mg analizirani su uz brzinu zagrijavanja od 10 °C/min, u temperaturnom području od 25°C do 700°C, u struji dušika.

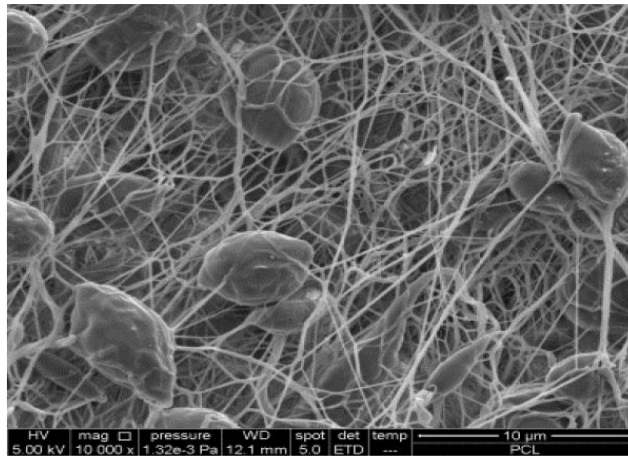


Slika 17. Termogravimetar, Q500, TA Instruments

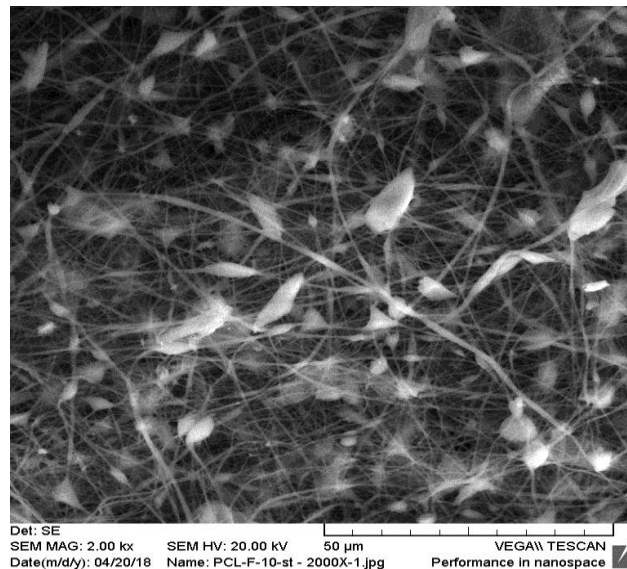
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje morfologije elektroispređenih PCL/SF vlaknastih matova elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM)

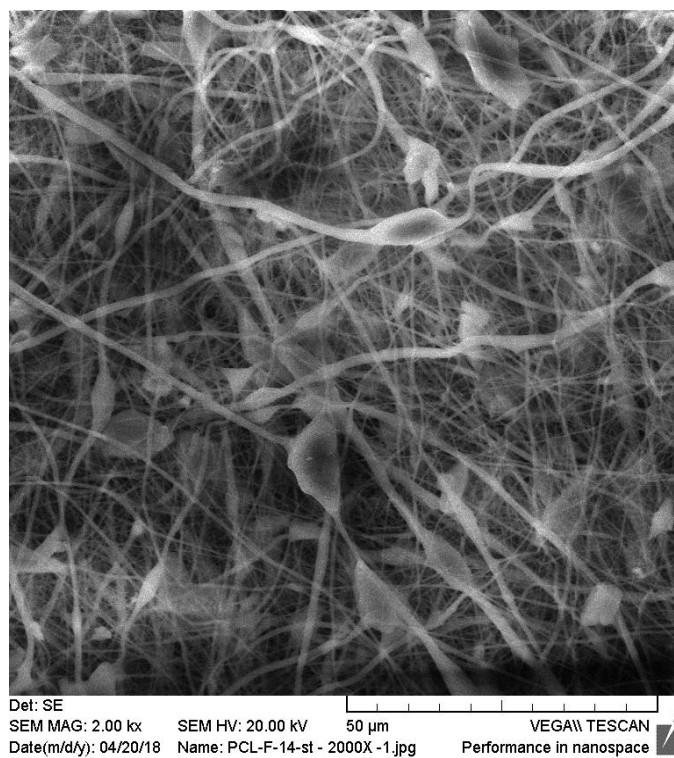
Općenito na morfološku strukturu i promjer vlakana elektroispređenih vlaknastih nosača utječu svojstva otopine (viskoznost, električna provodnost, napetost površine) te parametri procesa elektroispređanja (napon, protok otopine, promjer igle i udaljenost između igle i kolektora). Na SEM mikrografiji elektroispređenog PCL vlaknastog nosača (slika 18 a)) vidljiva je raspodjela vlakana većeg promjera uz deformacije (grudice) okruglog oblika po duljini vlakana u usporedbi s PCL/SF vlaknima koji imaju manji promjer i manje deformacija (slike 18 b),c) i d)). Ovo ponašanje može se dovesti u vezu s električnom provodnošću koja raste dodatkom i povećanjem udjela fibroina svile.



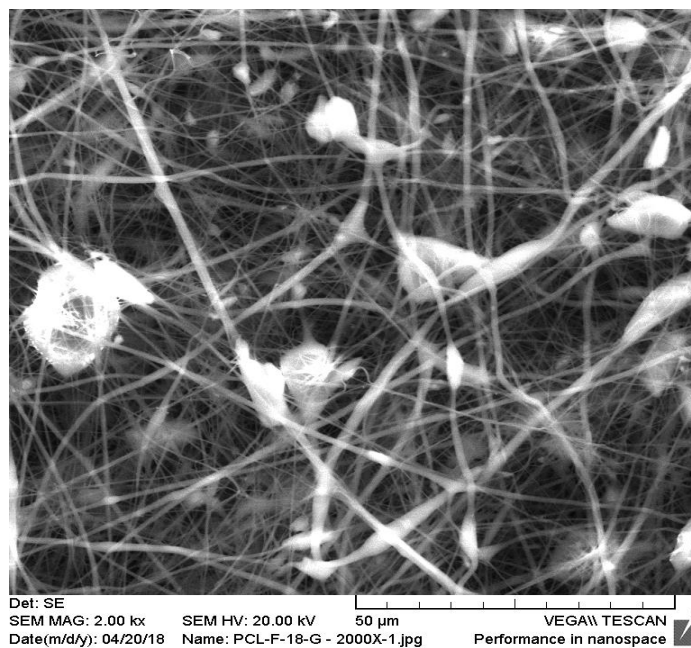
a)



b)



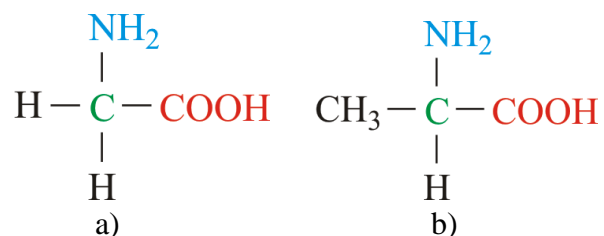
c)



d)

Slika 18. SEM mikrografije elektroispredenih PCL/fibroin svile vlaknastih nosača a) PCL b) 10% PCL/ SF, c) 14% PCL/ SF i d) 18% PCL/ SF

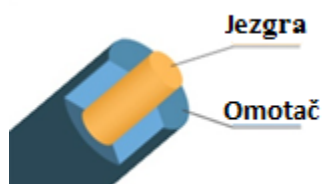
Prema literaturi [48] fibroin svile sastoji se od hidrofobnih blokova koji se sastoje od kratkih lanaca aminokiselina kao Glicin (Gly-2-aminooctena kiselina) (slika 19 a)) i Alanin (Ala-2-aminopropanska kiselina) (slika 19b)) i hidrofилnih blokova s kompleksnijim dijelovima koji sadrže velike lance aminokiselina.



Slika 19. a) Glicin (Gly-2) i b) Alanin (Ala-2)

S druge strane, molekulska masa komponenata jedan je od važnih čimbenika za kontrolu fazne odijeljenosti. Wei i suradnici pokazali su da morfologija fazno odijeljenih nanovlakana ovisi o relativnom omjeru dvaju polimera s različitom molekulskom masom [49].

Nanovlakna koja se sastoje od većeg udjela polimera s većom molekulskom masom imaju ko-kontinuiranu strukturu dok u slučaju ako je veći udio polimera s manjom molekulskom masom fazna morfologija nanovlakana se mijenja iz ko-kontinuirane u strukturu (poprečni presjek) jezgra-omotač (slika 20). Fibroin svile je polipeptid s velikom molekulskom masom koji se sastoji od 25kDa (lakši lanac) i 325 kDa (teži lanac) u usporedbi s visokomolekulskim PCL (90 kDa). Prema tome, kad se poveća udio FS za očekivati je da će doći do promjene morfologije nanovlakana iz tipične strukture jezgra/omotač u ko-kontinuiranu strukturu [50]. Molekule FS s manjom molekulskom masom (25 kDa) biti će prisutne na površini PCL/FS vlaknastog nosača zbog njihove veće difuzijske sposobnosti u odnosu na PCL.



Slika 20. Struktura poprečnog presjeka FS jezgra/omotač

Diezel i suradnici [51] pokazali su da površinska napetost otopine i viskoznost igraju važnu ulogu u određivanju raspona koncentracija iz kojih se mogu dobiti kontinuirana vlakna

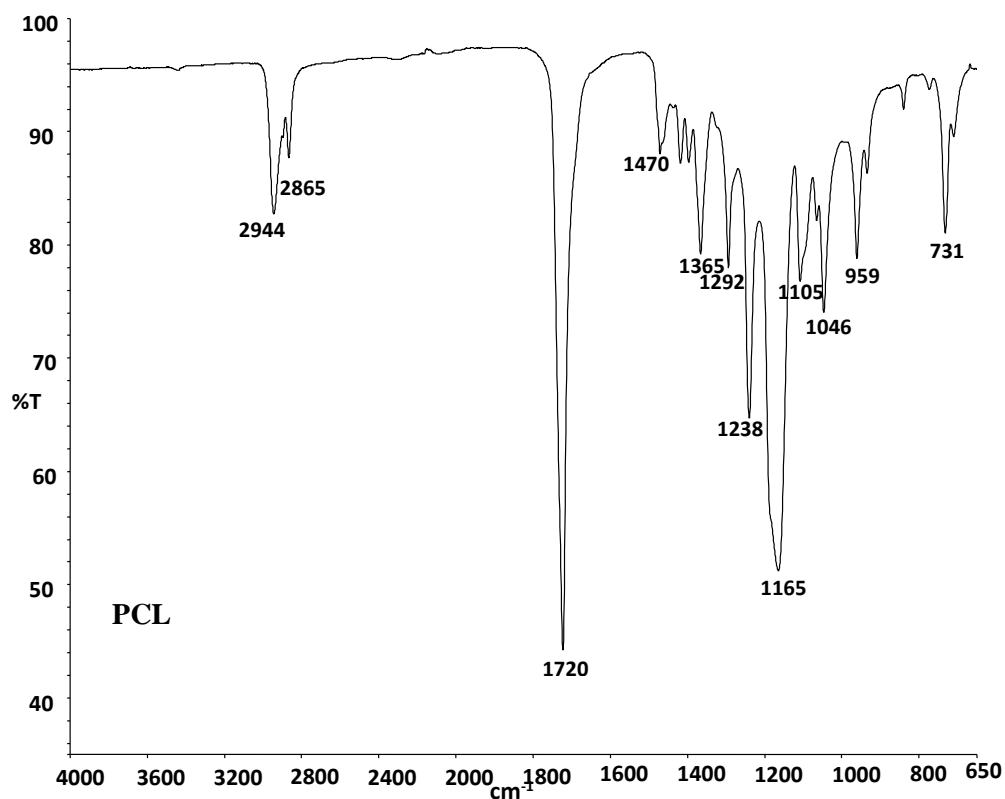
tijekom elektroispredanja. S povećanjem koncentracije fibroina svile, morfologija vlakana se mijenja od vretenastih zrnatih struktura do ujednačenih vlakana.

Kod većih koncentracija PCL-a dolazi do smanjenja udjela vretenastih zrnatih struktura i vlakna postaju tanja.

4.2. Rezultati dobiveni FTIR spektroskopijom

Na slici 21 prikazan je FTIR spektrogram elektroispredenog PCL vlaknastog nosača. Javlja se karakteristične vrpce na 2943 i 2860 cm^{-1} koje odgovaraju istezanju CH_2 asimetričnih veza odnosno simetričnih CH_2 veza, vrpce na 1722 cm^{-1} pripisuju se vibracijama istezanja esterske karbonilne veze ($\text{C}=\text{O}$) u amorfnoj fazi [52].

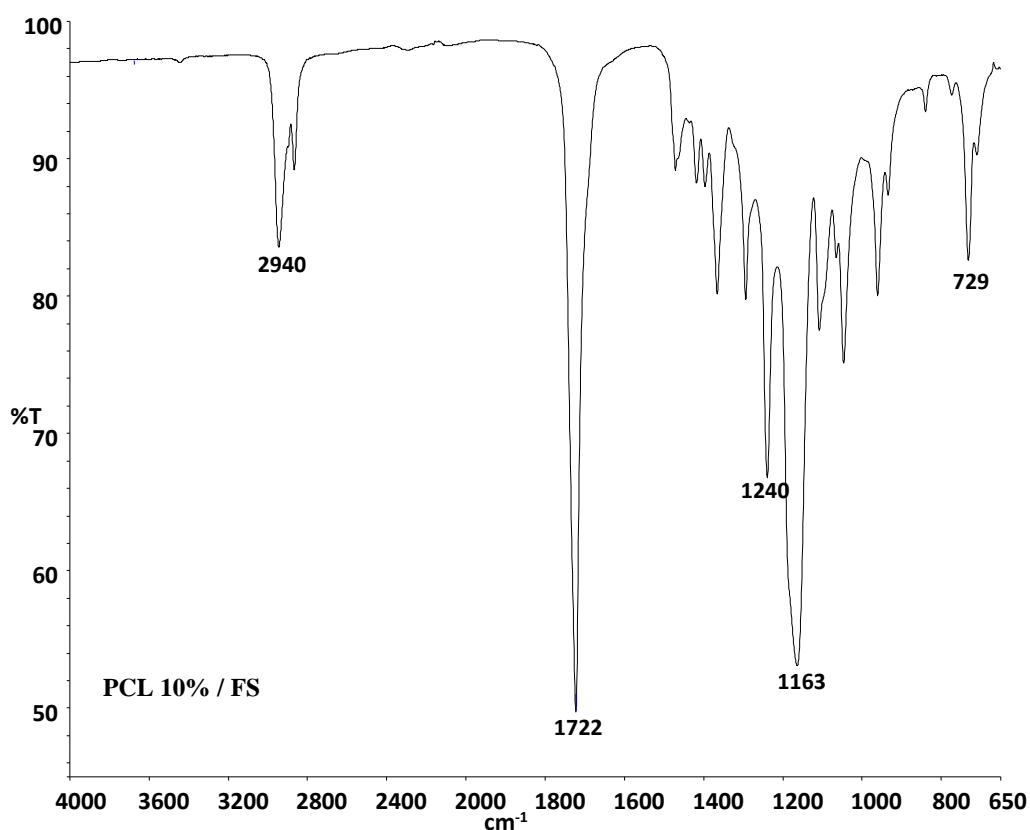
Vrpca na 1466 cm^{-1} javlja se zbog kutnih deformacija C-H veze. Na 1293 cm^{-1} javlja se vrpca koja odgovara istezanju veza kristalne faze PCL-a (C-C i C-O). Deformacija -C-C(=O)-O-skupina vidljiva je na 1166 cm^{-1} , dok je na 732 cm^{-1} vidljivo istezanje - CH_2 -skupina [53].



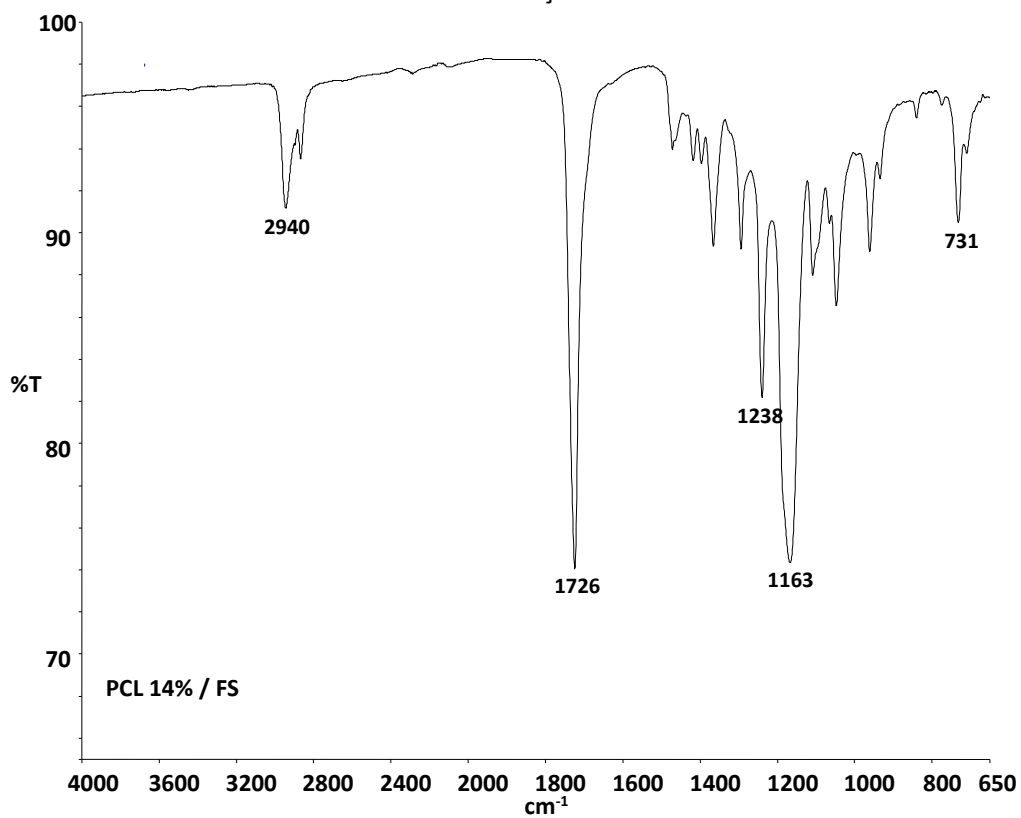
Slika 21. FTIR spektrogram PCL vlaknastog nosača

Na slikama 22-25 prikazani su FTIR spektri za različite koncentracije PCL/ FS vlaknaste nosače. FTIR spektroskopija je korisna tehnika za istraživanje promjena u strukturi i konformacijskih promjena materijala na osnovi fibroina svile. Općenito se kod proteina (SF) javljaju dvije glavne apsorpcijske vrpce vezane za apsorpciju peptidnih „kostura“ amida I i amida II [54,55]. Kod PCL 16 %/FS i PCL 18 %/FS javljaju se karakteristične apsorpcijske vrpce vezane za fibroin svile koje se nalaze na valnim duljinama od 1625 cm^{-1} , 1528 cm^{-1} i 1230 cm^{-1} koje se pripisuju amidu I, II i III [56].

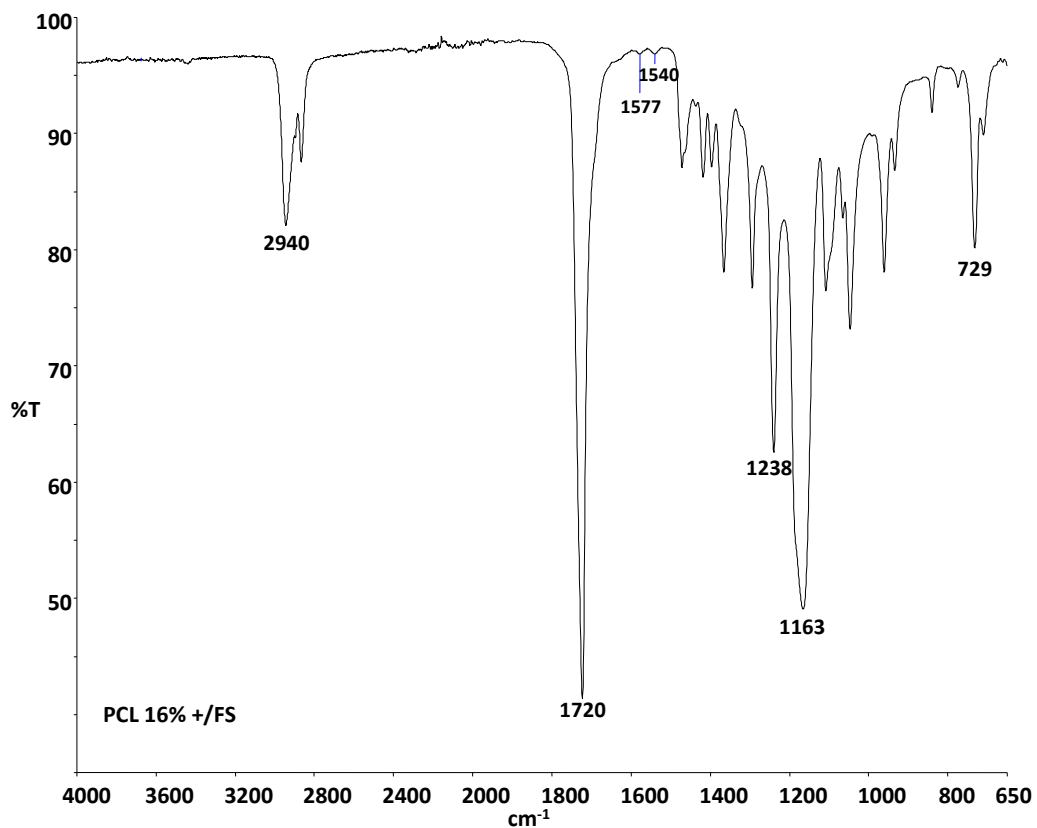
Apsorpcijska vrpca na 1621 cm^{-1} pripisuje se konformaciji β - pločastih nanokristala povezanih H-vezama (svila II) dok se apsorpcijske vrpce na manjim valnim duljinama $1518\text{--}1577\text{ cm}^{-1}$ pripisuje amorfnoj fazi FS nasumične spirale (amidu I, svila I) [56] (slika 5).



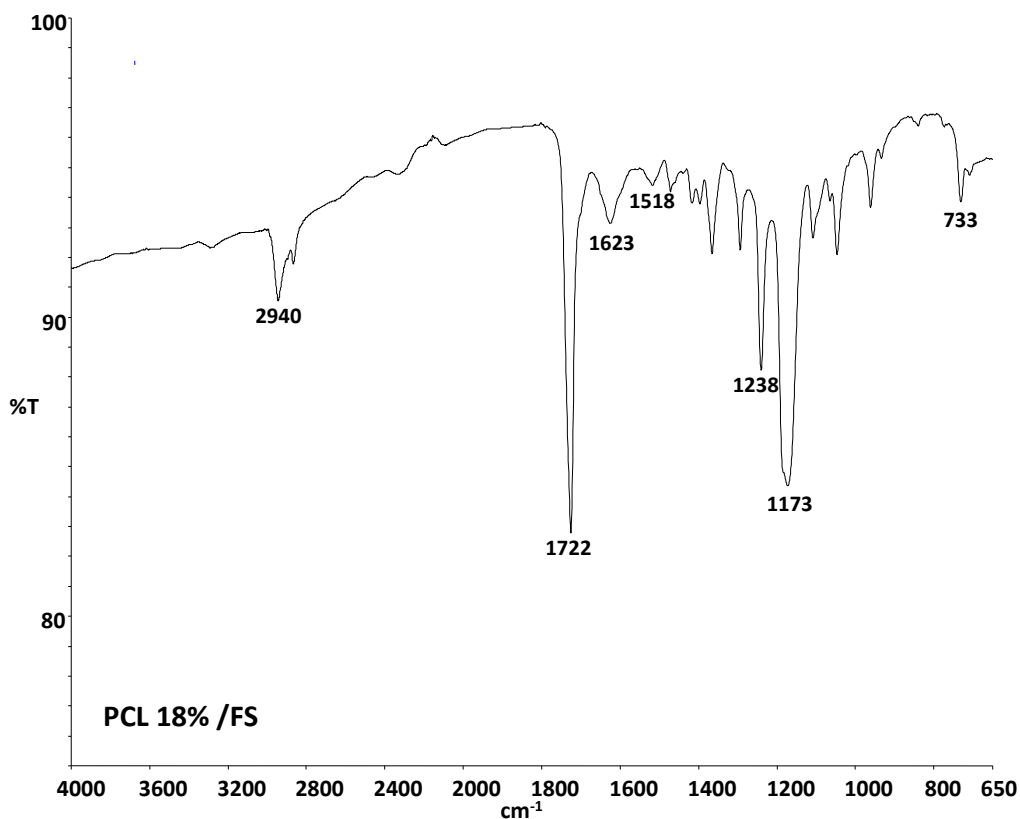
Slika 22. FTIR spektrogram PCL 10% / FS vlaknasti nosač



Slika 23. FTIR spektrogram PCL 14% / FS vlaknasti nosač



Slika 24. FTIR spektrogram PCL 16% / FS vlaknasti nosač

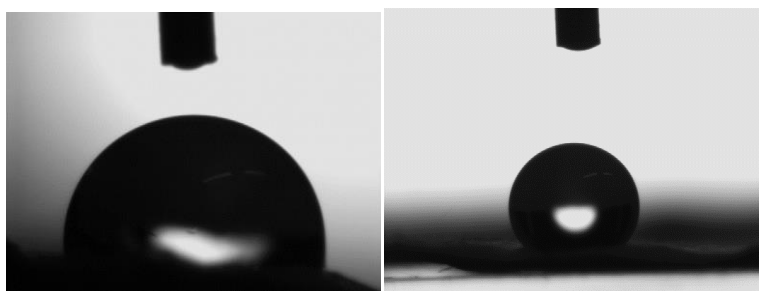


Slika 25. FTIR spektrogram PCL 18% / FS vlaknasti nosač

4.3. Rezultati dobiveni mjerenjem kontaktnog kuta s vodom

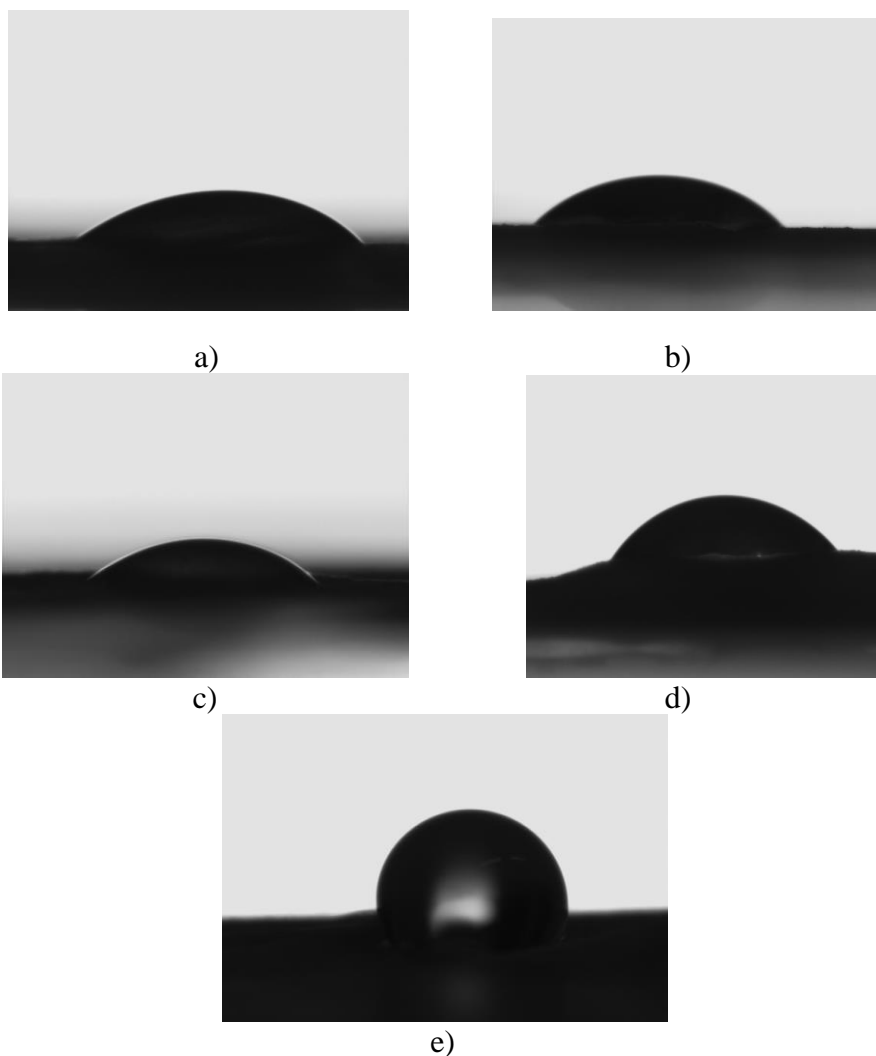
Općenito se iz vrijednosti kontaktnih kutova mogu utvrditi interakcije između površine uzoraka i vode. Kontaktni kut određen je metodom viseće kapi (*Sessile drop*) pomoću vode, pri čemu je ispitano vlaženje elektroispredenog PCL/FS vlaknastog nosača. Kontaktnim kutom s vodom određen je utjecaj fibroina svile i njegove koncentracije na površinsku sposobnost kvašenja elektroispredenih PCL/FS vlaknastih nosača.

Poznato je da PCL vlaknasti nosači imaju kontaktni kut s vodom oko 80 °. Rezultati istraživanja kontaktnog kuta s vodom za elektroispredeni PCL vlaknasti nosač prikazani su na slici 26 i ukazuju na hidrofobnu strukturu nosača ($125,8 \pm 5,6^\circ$).



Slika 26. Kontaktni kut s vodom za elektroispredeni PCL vlaknasti nosač

Nakon mjerenja kontaktnog kuta s vodom za PCL vlaknasti nosača prevedeno je mjerenje za elektroispredene PCL/FS vlaknaste nosače s različitim udjelima PCL-a. Rezultati su navedeni u tablici 1 i prikazani na slici 27.



Slika 27. Kontaktni kut s vodom za elektroispredeni: a) 10% PCL/ FS, b) 12% PCL/FS, c) 14% PCL/FS, d) 16% PCL /FS i e) 18% PCL +/FS vlaknasti nosač

Dobiveni rezultati kontaktnog kuta ukazuju da dodatkom FS dolazi do smanjenja hidrofobnosti elektroispredjenih PCL/FS vlaknastih nosača, a kontaktni kut iznosi: $46,5 \pm 4,3^\circ$ (10% PCL / FS), $47,8 \pm 3,0^\circ$ (12% PCL/FS), $38,8 \pm 2,7^\circ$ (14% PCL/ FS), $48,5 \pm 5,5^\circ$ (16% PCL/FS) i $105,2^\circ$ (18% PCL/FS). Ovo ponašanje može se pripisati hidrofilnim amino i karboksilnim skupinama koje se nalaze u FS, a na površini vlaknastog nosača.

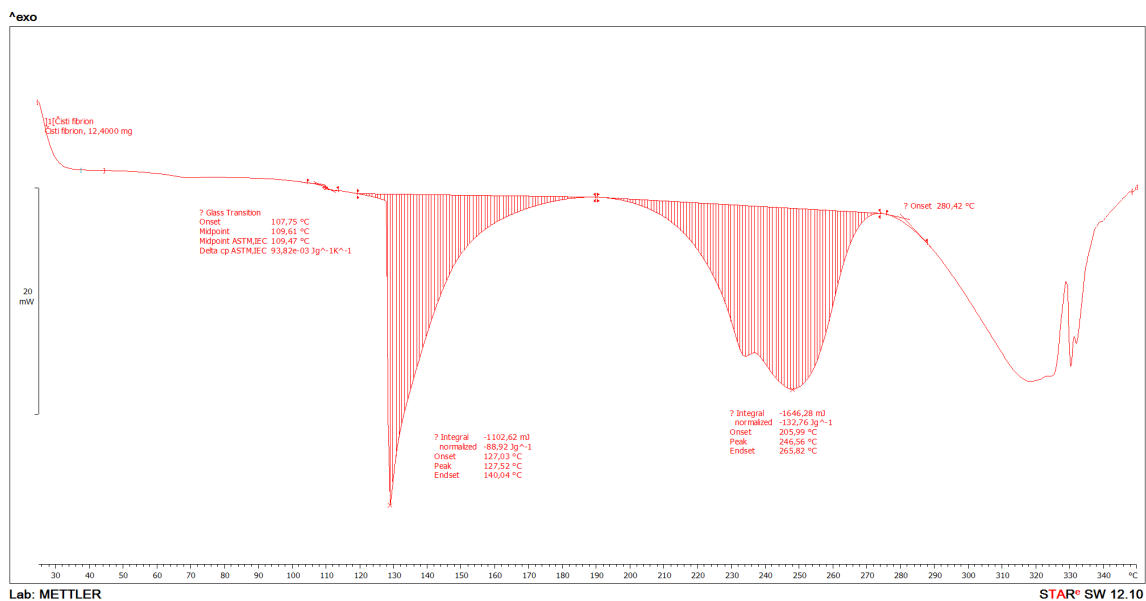
Tablica 1. Prikaz rezultata određivanja kontaktnog kuta za PCL i PCL/SF vlaknaste nosače

| Uzorak | $\Theta/^\circ$ |
|-------------|-----------------------|
| 18% PCL | $125,8 \pm 5,6^\circ$ |
| 10% PCL + F | $46,5 \pm 4,3^\circ$ |
| 12% PCL + F | $47,8 \pm 3,0^\circ$ |
| 14% PCL + F | $38,8 \pm 2,7^\circ$ |
| 16% PCL + F | $48,5 \pm 5,5^\circ$ |
| 18% PCL + F | $105,2^\circ$ |

4.4. Rezultati dobiveni diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC)

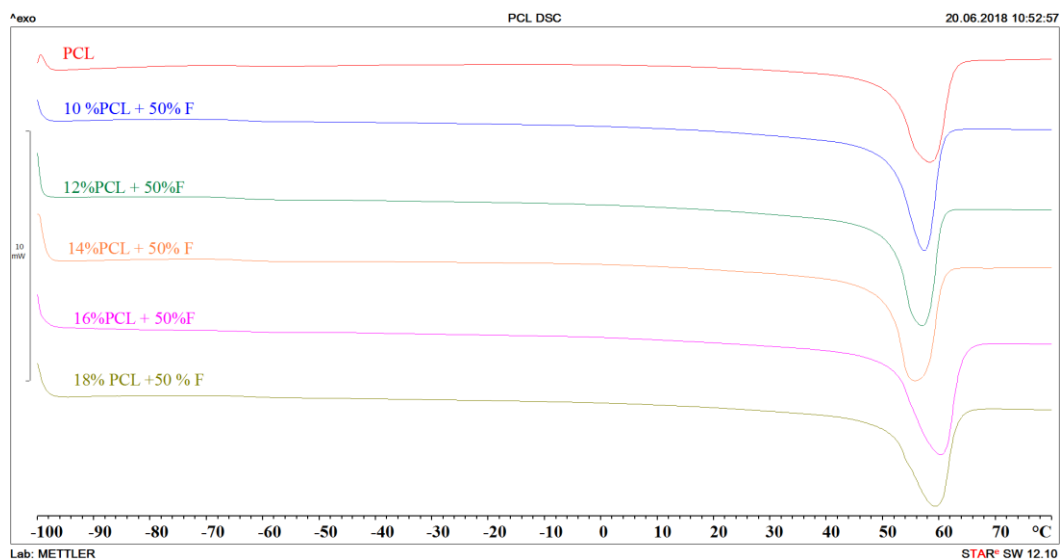
Za određivanje toplinskih svojstava elektroispredjenih PCL i PCL/ FS vlaknastih nosača primijenjena je DSC analiza. Određeni su fazni prijelazi: talište (T_m), kristalište (T_k) kao i stupanj kristalnosti (χ_c).

Na slici 28 prikazana je DSC krivulja fibroina svile na kojoj je dobivena temperatura staklastog prijelaza na 109°C koji odgovara amorfnoj fazi FS te tri endotermna prijelaza na oko 128°C , 247°C i 280°C . Prema literaturnim podacima [57] pojava endotermnog prijelaza s temperaturom taljenja na oko 130°C može biti povezana s taljenjem Svile I (nasumičnih spirala). Endotermni prijelaz s temperaturom taljenja na 247°C odgovara taljenju β -pločasti nanokristala u svili II. β -pločasti nanokristali imaju strukturu s manjim stupnjem uređenosti [57]. Temperatura koja se javlja na 280°C može se pripisati početku razgradnje FS lanaca koji imaju neorijentiranu i loše uređenu kristalnu strukturu.

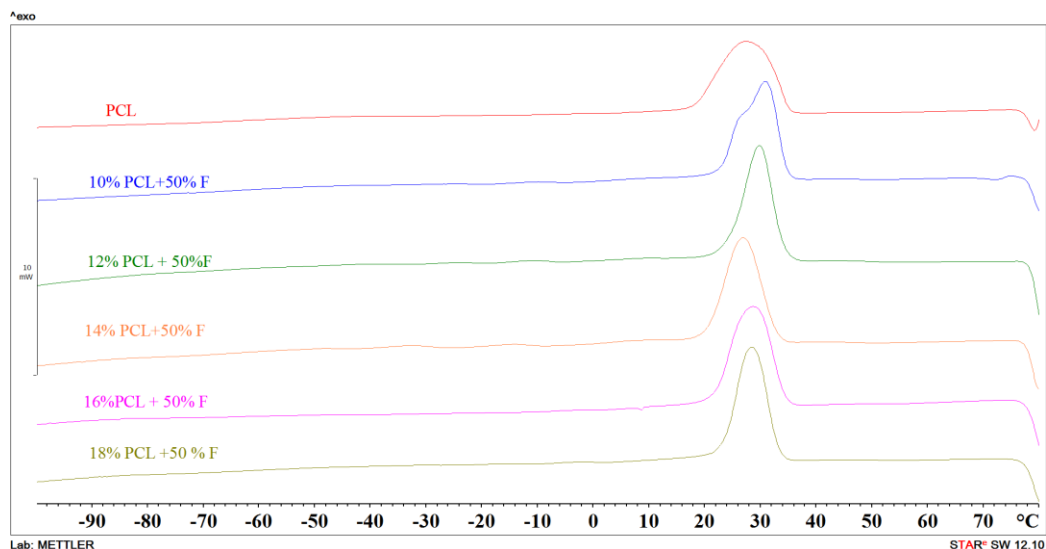


Slika 28. DSC krivulja zagrijavanja za fibroin svile.

Na slici 29 dane su DSC krivulje zagrijavanja (29 a)) i hlađenja (29 b)) za elektroispređeni PCL vlaknasti nosač i i PCL/FS vlaknaste nosače s različitim koncentracijama FS. U tablici 2 prikazani su rezultat dobiveni DSC mjerenjem.



a)



b)

Slika 29. Krivulje zagrijavanja i hlađenja elektroispredenih PCL i PC/FS vlaknastih nosača

Na krivulji zagrijavanja elektroispredenog PCL vlaknastog nosača dobiveno je staklište na $-63,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i talište na $58,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ te jedan endotermni prijelaz vezan za taljenje kristalne faze PCL s temperaturom taljenja na $58,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ dok je na krivulji hlađenja dobiven jedan egzotermni prijelaz vezan za kristalizaciju PCL na temperaturi od $27,6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dodatkom fibroina svile staklište se povećava dok se talište smanjuje, razlog tomu može biti nastajanje slabije uređene kristalne strukture nastale dodatkom fibroina svile. Dodatak fibroina svile utječe na smanjivanje stupanja kristalnosti, dok se temperatura kristalizacije povećava u odnosu na čisti elektroispredeni PCL vlaknasti nosač.

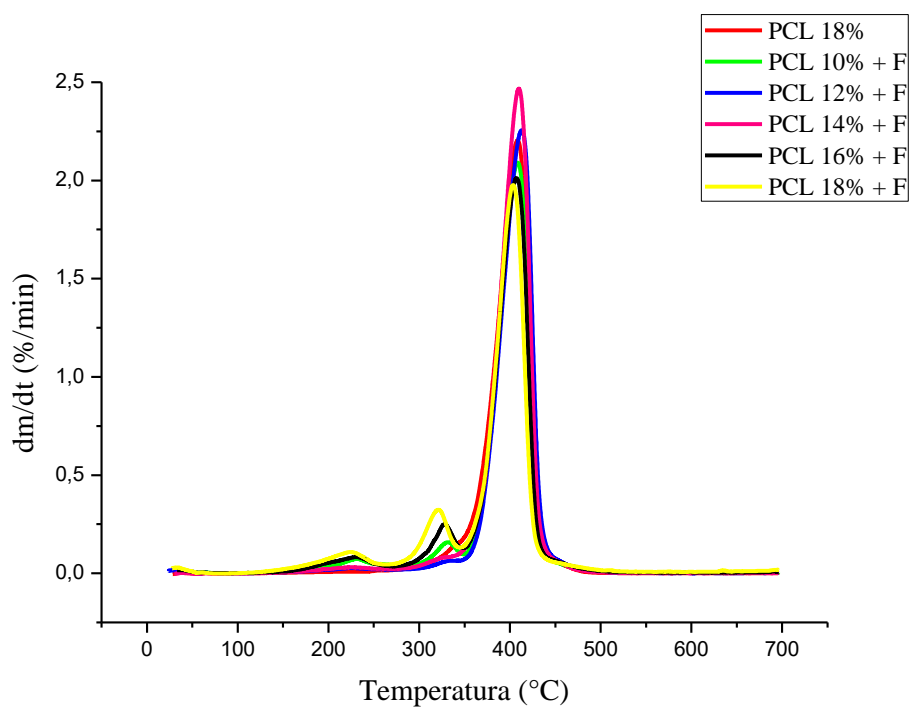
Tablica 2. Rezultati dobiveni DSC analizom za elektroispredeni PCL i PCL/FS vlaknaste nosače

| uzorak | $T_g/ ^{\circ}\text{C}$ | $T_m/ ^{\circ}\text{C}$ | $T_c/ ^{\circ}\text{C}$ | $\Delta H_m/\text{Jg}^{-1}$ | $\chi_c/\%$ |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------|
| PCL | -63,4 | 58,2 | 27,6 | 58,97 | 41,5 |
| PCL 10% + F | -63,9 | 57,1 | 31,0 | 56,11 | 39,5 |
| PCL 12% + F | -65,7 | 56,8 | 30,1 | 63,05 | 44,4 |
| PCL 14% + F | -63,7 | 55,6 | 27,0 | 55,34 | 39,0 |
| PCL 16% + F | -64,0 | 60,0 | 28,9 | 55,92 | 39,4 |
| PCL 18% + F | -63,1 | 59,2 | 28,7 | 50,60 | 35,6 |

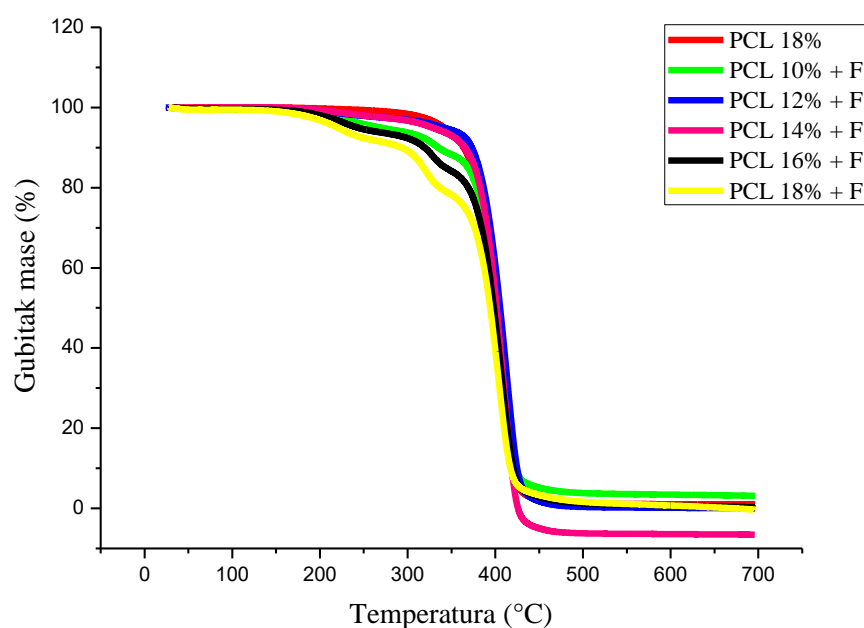
4.5. Rezultati dobiveni termogravimetrijskom analizom (TGA)

S ciljem određivanja toplinske stabilnosti PCL i PCL/SF vlaknastih nosača dobivenih elektroispredanjem i utjecaja dodatka fibroina svile na toplinsku stabilnost elektroispedenih vlaknastih nosača provedena su termogravimetrijska mjerenja. Općenito, toplinska stabilnost se prati iz promjene temperature na kojoj dolazi do početka razgradnje, odnosno gubitka mase.

Na slikama 30 i 31 te tablici 3 prikazani su dobiveni TGA rezultati za elektroispredene PCL i PCL/FS vlaknaste nosače s različitom koncentracijom FS.



Slika 30. DTG krivulje za elektroispredene PCL i PCL/FS vlaknaste nosače



Slika 31. TG krivulje za elektrospredene PCL i PCL/FS vlaknaste nosače

Iz DTG krivulje elektrospredenog PCL vlaknastog nosača vidljivo je da se razgradnja PCL odvija u jednom stupnju razgradnje s temperaturom pri maksimalnoj brzini razgradnje od 408,4°C. Početka razgradnje PCL vlaknastog nosača određen je iz TG krivulje i iznosi ~ 350 ° C te je ostatak mase nakon 700 ° C približno jednak nuli [58]. Gubitak mase za fibroin svile počinje nakon 250°C, dok se maksimum brzine razgradnje javlja oko 330°C. Početak razgradnje fibroina svile počinje na ~ 100 ° C i pripisuje se vlazi. Dodatkom fibroina svile u elektrosprednim PCL/FS vlaknastim nosačima dolazi do pojave tri stupnja razgradnje, prva dva stupnja vezana su za toplinsku razgradnju FS dok je treći stupanj razgradnje na višim temperaturama vezan za razgradnju PCL, temperature maksimalne brzine razgradnje su na 321 do 336°C i 403 do 413°C ovisno o koncentraciji PCL. Povećanjem udjela PCL dolazi do smanjenja toplinske stabilnosti elektrospredenih PCL/FS vlaknastih nosača. Istodobno je vidljivo povećanje intenziteta stupnja razgradnje vezano za razgradnju FS. Ovaj rezultat može ukazivati na miješanje PCL i FS, amorfna faza FS razrušava kristalnu fazu PCL (smanjuje se temperatura početka razgradnje) dok se kristalna faza PCL veže na β -pločaste nanokristale iz FS.

Tablica 3. Rezultati dobiveni TGA analizom elektroispređenih PCL i PCL/FS vlaknastih nosača

| Uzorak | T _{5%} /°C | T _K /°C | Δm ₁ /% | Δm ₂ /% | Δm ₃ /% | T _{max,1} /°C | T _{max,2} /°C | T _{max,3} /°C |
|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| PCL 18% | 340,9 | 425,5 | / | / | 98,8 | / | / | 408,4 |
| PCL 10% +F | 267,4 | 424,4 | 5,2 | 6,1 | 84,8 | 232,8 | 332,1 | 408,4 |
| PCL 12% +F | 339,2 | 430,3 | 2,5 | 2,6 | 93,5 | 200,7 | 335,8 | 412,9 |
| PCL 14% +F | 329,2 | 426,2 | 2,0 | 3,9 | 99,7 | 224,7 | 325,7 | 410,0 |
| PCL 16% +F | 241,6 | 424,5 | 5,6 | 9,1 | 83,5 | 230,4 | 327,8 | 407,5 |
| PCL 18% +F | 220,1 | 418,7 | 7,7 | 12,7 | 76,8 | 224,5 | 320,9 | 403,4 |

5. ZAKLJUČAK

Postupkom elektroispredanja dobiveni su PCL i PCL/FS vlaknasti nosači. Polikaprolakton (PCL) je korišten kao polimerna otopina za izradu vlaknastog nosača, u koji je naknadno dodan fibroin svile kako bi se formirao dvosloj. Uočeno je da parametri otopine, procesni parametri i okolišni parametri kao što su viskoznost, molekulska masa, koncentracija polimera u otopini, napon, udaljenost mlaznice od kolektora, vodljivost otopine itd. značajno utječu na morfologiju vlakana te se promjenom tih parametara dobivaju željena svojstva vlaknastih nosača.

SEM analizom vidljivo je da je postupkom elektroispredanja dobivena jednolična struktura PCL/FS vlaknastih nosača s tanjim promjerom vlakana i homogenom raspodjelom SF unutar vlakana, dok je na SEM mikrografiji elektroispredenog PCL vlaknastog nosača vidljiva raspodjela vlakana većeg promjera uz deformacije okruglog oblika po duljini vlakana. Na FTIR spektrima elektroispredenih 16% PCL/FS i 18% PCL/FS vlaknastih nosača su vidljive su apsorpcijske vrpce fibroina svile na valnim duljinama od 1625 cm^{-1} , 1528 cm^{-1} i 1230 cm^{-1} .

Dodatkom fibroina svile smanjuje se kontaktni kut s vodom, jer se smanjuje hidrofobnost nosača. Dolazi do smanjenja kontaktnog kuta od $125,8 \pm 5,6^\circ$ do $38,8 \pm 2,7^\circ$. Ovo ponašanje može se pripisati hidrofilnim amino i karboksilnim skupinama koje se nalaze u FS i na površini vlaknastog nosača.

Toplinska svojstva vlaknastih nosača određena su DSC iz koje je utvrđeno da se dodatkom fibroina svile povećava temperatura staklastog prijalaza, dok se talište smanjuje uz smanjanje stupanja kristalnosti. Razlog tomu je nastajanje slabije uređene kristalne strukture nastale dodatkom fibroina svile.

Termogravimetrijskom analizom karakterizirana je toplinska stabilnost vlaknastih nosača. Modificiranjem PCL nosača dodatkom fibroina svile smanjuje se toplinska stabilnost PCL/FS vlaknastih nosača.

6. LITERATURA

- [1] Kundu, B., et al. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations, *Adv. Drug Del. Rev.*, **65** (4) (2013) 457-470.
- [2] Altman, Gregory H., et al. Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, **24** (3) (2003) 401-416.
- [3] Vepari, Charu; Kaplan, David L., Silk as a biomaterial, *Prog. Poly. Sci.*, **32** (8-9) (2007) 991-1007.
- [4] Melke, Johanna, et al., Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering, *Acta Biom.*, **31** (2016) 1-16.
- [5] Chen, Fujia; Porter, David; Vollrath, Fritz, Morphology and structure of silkworm cocoons, *Mater. Sci. Eng.: C*, **32** (4) (2012) 772-778.
- [6] Porter, David; Vollrath, Fritz, Silk as a biomimetic ideal for structural polymers, *Adv. Mater.*, **21** (4) (2009) 487-492.
- [7] Meinel, L.; Kaplan, D.L. Silk constructs for delivery of musculoskeletal therapeutics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **64** (2012) 1111–1122.
- [8] Omenetto, F.G.; Kaplan, D.L. New Opportunities for an Ancient Material, *Science* **329** (2010) 528–531.
- [9] Zhao, Zheng; LI, Yi; XIE, Mao-Bin, Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery *Int. J. Mol. Sci.*, **16** (3) (2015) 4880-4903.
- [10] Nakazawa, Yasumoto, et al., Development of small-diameter vascular grafts based on silk fibroin fibers from *Bombyx mori* for vascular regeneration, *J. Biom. Sci., Polymer Edition*, **22** (1-3) (2011) 195-206.
- [11] Roh, Dae-Hyun, et al., Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat, *J. Mater. Sci.: Mater. Medic.*, **17** (6) (2006) 547-552.
- [12] Mandal, Biman B., et al., High-strength silk protein scaffolds for bone repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109** (20) (2012) 7699-7704.
- [13] Seal, B. L.; Otero, T. C.; Panitch, A, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Mater. Sci. Eng.: R: Reports*, **34** (4-5) (2001) 147-230.
- [14] Kundu, Banani, et al., Silk proteins for biomedical applications: bioengineering perspectives. *Prog. Poly. Sci.*, **39** (2) (2014) 251-267.
- [15] Kolind, Kristian, et al., Guidance of stem cell fate on 2D patterned surfaces. *Biomaterials*, **33** (28) (2012) 6626-6633.
- [16] McMurray, R. J., et al., Surface topography regulates wnt signaling through control of primary cilia structure in mesenchymal stem cells, *Sci. Rep.*, **3** (2013) 3545.
- [17] Badylak, Stephen F.; Freytes, Donald O.; Gilbert, Thomas W., Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater.* **5** (1) (2009) 1-13.
- [18] Vroman, I., Tighzert, L., Biodegradable polymers, *Materials*, **2** (2009) 309 – 310.
- [19] Labet, M., Thielemans, W., Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.*, **38** (12) (2009) 3484-3485.
- [20] Agić, A., Teorijske osnove i procesni parametri elektropredenja, *Polimeri*, (2005) 116
- [21] Zdraveva, E., Magovac, E., Mijović, B., Elektroispredanje – značajna tehnika 21. stoljeća, *Tekstil: časopis za tekstilnu i odjevnu tehnologiju* **65** (11-12) (2016) 397-398.
- [22] Raghavan, P. et al., Electrospun polymer nanofibers: the booming cutting edge technology, *Reac. Func. Poly.* **72** (12) (2012) 918.
- [23] Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., Farson, D., Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C* **27** (2007) 505.
- [24] Doshi, J. et al. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Industry Applications Society Annual Meeting, 1993, Conference Record of the 1993 IEEE: IEEE;* (1993)1698-1703.

- [25] Angammana, C. J., et al., A theoretical understanding of the physical mechanisms of electrospinning. Proceedings of the ESA Annual Meeting on Electrostatics(2001) 2.
- [26] Cheryl, L., Casper, Jean S. Stephens, Nancy G. Tassi, D. Bruce Chase, John F. Rabolt, Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process, *Macromolecules*, **37** (2) (2004) 573-578.
- [27] Li, Z.; Wang, C., Effects of working parameters on electrospinning, One-dimensional nanostructures, Springer Berlin Heidelberg, (2013) 15-28.
- [28] Sill, Travis J.; Von Recum, Horst A., Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, **29** (13) (2008) 1989.
- [29] Liu, Bin, et al. Silk structure and degradation, *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, **131** (2015) 122-128.
- [30] Koh, L.; Cheng, Y.; Teng, C.; Khin, Y.; Loh, X.; Tee, S.; Low, M.; Ye, E.; Yu, H.; Zhang, Y.; et al., Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials, *Prog. Polym. Sci.* **46** (2015) 86–110.
- [31] Mori, K.; Tanaka, K.; Kikuchi, Y.; Waga, M.; Waga, S.; Mizuno, S., Production of a Chimeric Fibroin Light-chain Polypeptide in a Fibroin Secretion-deficient Naked Pupa Mutant of the Silkworm *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.* **251** (1995) 217–228.
- [32] Tanaka, K.; Inoue, S.; Mizuno, S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H–L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect. Biochem. Mol.* **29** (1999) 269–276.
- [33] Inoue, Satoshi, et al., Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6: 6: 1 molar ratio, *J. Biol. Chem.*, **275** (51) (2000) 40517-40528.
- [35] Volkov V., Ferreira A.V., Cavaco-Paulo A., On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing Toward Silk-Inspired Materials: A Review. *Macromol. Mater. Eng.*, **300** (2015)1199–1216.
- [36] Valluzzi, Regina, et al. ,Orientation of silk III at the air-water interface. *Int. J. Biol. Macromol.*, **24** (2-3) (1999) 237-242.
- [37] Drummy, Lawrence F., et al., Thermally induced α -helix to β -sheet transition in regenerated silk fibers and films, *Biomacromolecules*, **6** (6) (2005) 3328-3333.
- [38] Phillips, David M., et al., Regenerated silk fiber wet spinning from an ionic liquid solution, *J. Mater. Chem.*, **15** (39) (2005) 4206-4208.
- [39] Mandal, Biman B.; Kundu, S. C., A novel method for dissolution and stabilization of non-mulberry silk gland protein fibroin using anionic surfactant sodium dodecyl sulfate. *Biotech. Bioeng.*, **99** (6) (2008) 1482-1489.
- [40] Luo, K.; Yang, Y.; Shao, Z. ,Physically Crosslinked Biocompatible Silk-Fibroin-Based Hydrogels with High Mechanical Performance. *Adv. Funct. Mater.* **26** (2016) 872–880.
- [41] Ghosh, S.; Parker, S.T.; Wang, X.; Kaplan, D.L.; Lewis, J.A. Direct-Write Assembly of Microperiodic Silk Fibroin Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *Adv. Funct. Mater.* **18** (2008) 1883–1889.
- [29]..=42????
- [43] McCool, J., Silk Fibroin-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications, (2011), 2-6.
- [44] Dvir, Tal, et al., Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature nanotechnology*, **6** (1) (2011) 13.
- [45] Catherine M. Rogers, Gavin E. Morris, Toby W. A. Gould, Robert Ball, Sotiria Toumpaniari, Helen Harrington, James E. Dixon, Kevin M. Shakesheff, Joel Segal, Felicity R. A. J. Rose, A novel technique for the production of electrospun scaffolds with tailored

- three-dimensional micro-patterns employing additive manufacturing, *Biofabrication*, (2014) 1.
- [46] Shah Hosseini, Neda, et al. ,Novel 3D electrospun polyamide scaffolds prepared by 3D printed collectors and their interaction with chondrocytes. *Inter. J. Poly. Mater. Polym. Biom.*, **67** (3) (2018) 143-144.
- [47] Do, Anh-Vu, et al., 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications. *Adv. Health. Mat.*, 4 (12) (2015) 1742.
- [48] Zhang, Kuihua, et al., Fabrication of silk fibroin blended P (LLA-CL) nanofibrous scaffolds for tissue engineering, *J. Biom. Mater. Res. Part A*, **93** (3) (2010) 984-993.
- [49] Wei, Ming, et al., Core-Sheath Structure in Electrospun Nanofibers from Polymer Blends, *Macrom. Mater. Eng.*, **291** (11) (2006) 1307-1314.
- [50] Jin, Hyoung-Joon; Kaplan, David L., Mechanism of silk processing in insects and spiders, *Nature* **424** (6952) (2003) 1057-1061.
- [51] Deitzel, Joseph M., et al., The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer*, **42** (1) (2001) 261-272.
- [52] S. Zhou, X. Deng, H. Yang, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system. *Biomaterials*. **24** (2003) 3563.
- [53] M. Shoja, K. Shambeli, M. B. Ahmad, K. Kalantari, Synthesis and characterization of strontium doped zinc manganese titanate ceramics. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **10** (2015) 169.
- [54] Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., & Yu, S., Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy, *Natu. Prot.*, **10** (3) (2015) 382-396.
- [55] Lu, Q., Hu, X., Wang, X., Kluge, J. A., Lu, S., Cebe, P., & Kaplan, D. L., Water-insoluble silk films with silk I structure. *Acta Biomat.* **6** (4) (2010) 1380-1387.
- [56] Wilson, Donna; Valluzzi, Regina; Kaplan, David., Conformational transitions in model silk peptides, *Bioph. J.*, **78** (5) (2000) 2690-2701.
- [57] Lim, C. T., Tan, E. P. S., Ng, S. Y., Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers. *Applied. Physics. Letters*. **92** (14) (2008) 2231-2234.
- [58] Chen, J.P.; Chang, Y.S. Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids Surf. B* **86** (2011) 169–175.

Životopis

████████████████████ Srednju školu sam završila u Požegi nakon čega sam upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.