

Nanovlaknasti materijali ciljane topografije izrađeni kombinacijom elektroispredanja i 3D printanja

Čipčić, Tonko

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Textile Technology / Sveučilište u Zagrebu, Tekstilno-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:201:254940>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

[Faculty of Textile Technology University of Zagreb - Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
TEKSTILNO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
TEKSTILNA TEHNOLOGIJA I INŽENJERSTVO

DIPLOMSKI RAD

**NANOVLAKNASTI MATERIJALI CILJANE TOPOGRAFIJE IZRAĐENI
KOMBINACIJOM ELEKTROISPREDANJA I 3D PRINTANJA**

TONKO ČIPČIĆ

Zagreb, ožujak 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
TEKSTILNO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
TEKSTILNA TEHNOLOGIJA I INŽENJERSTVO
PROJEKTIRANJE I MENADŽMENT TEKSTILA

DIPLOMSKI RAD

**NANOVLAKNASTI MATERIJALI CILJANE TOPOGRAFIJE IZRAĐENI
KOMBINACIJOM ELEKTROISPREDANJA I 3D PRINTANJA**

PROF. DR. SC. BUDIMIR MIJOVIĆ

TONKO ČIPČIĆ

Zagreb, ožujak 2018.

Ovaj rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Budimira Mijovića i neposredne voditeljice dr. sc. Emilije Zdraveve.

Broj stranica: 53

Broj slika: 25

Broj tablica: 11

Broj grafova: 29

Broj matematičkih izraza: 1

Broj literaturnih izvora: 40

Sastav povjerenstva:

Prof. dr. sc. Zenun Skenderi, predsjednik povjerenstva

Prof. dr. sc. Budimir Mijović, član

Izv. prof. dr. sc. Antoneta Tomljenović, članica

Doc. dr. sc. Dragana Kopitar, zamjenik člana

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

SAŽETAK

Elektroispredeni materijali su se pokazali kao dobri kandidati za uzgoj tkivnih stanica odnosno kao odgovarajuća alternativa u tkivnom inženjerstvu u odnosu na najčešće korištene prirodne nosače. Nanovlaknasta struktura je jako slična strukturi izvanstaničnog okruženja, velika poroznost i povezanost pora, kao i sama nanovlakna omogućuju prijenos kisika, hranjivih tvari, te odvoz tekućina. U svrhu poboljšanja adhezije, migracije, te infiltracije stanica u dublje slojeve, nosači imaju ciljanu strukturu površine, kao i ciljanu funkciju. U ovom radu izrađeni su elektroispredeni materijali, na bazi biorazgradivog polikaprolaktona (PCL), ciljane topografije, te je u istima enkapsuliran antibiotik cefuroxim (CFU), s ciljem primjene u uzgoju tkivnih stanica odnosno antibakterijskoj terapiji oka. U tu svrhu elektroispredeni PCL/CFU materijali pripremljeni su kombinacijom elektroispredanja i 3D printanja. Elektroispredena nanovlakna sakupljaju se na 3D printanim kolektorima ciljane geometrija temeljene na ponavljajuću jedinicu geometrijskog lika heksagona. Elektroispredanim PCL/CFU materijalima određena su: morfologija, poroznost, toplinska degradacija, ponašanje materijala pri vlačnom testu, te praćeno je otpuštanje antibiotika tijekom određenog vremena, u ovisnosti o koncentraciji cefuroxima i vrsti 3D printanog kolektora. Dodatak i povećanje koncentracije antibiotika utječe na promjenu promjera vlakana, te površinu pora, smanjuje toplinsku stabilnost PCL-a, te uglavnom povećava prekidnu čvrstoću. Kod obje koncentracije antibiotika od 5 i 10 % zabilježena je relativno ista promjena apsorbancije fiziološke otopine nakon 9 dana praćenja otpuštanja antibiotika. Promjena geometrije kolektora (povećanje visine centralnog valjka) ima najveći utjecaj na morfoloških karakteristika i poroznosti elektroispredenih materijala.

Ključne riječi: elektroispredanje, 3D printanje, elektroispredeni nosači, PCL/CFU, tkivno inženjerstvo.

SADRŽAJ

SAŽETAK	i
1. UVOD	1
1.1. Ciljevi rada.....	2
2. O TEHNOLOGIJI ELEKTROISPREDANJA I 3D PRINTANJA	3
2.1. Elektroispredanje.....	3
2.1.1. Elektroispredanje u tkivnom inženjerstvu	4
2.1.2. Prirodni polimeri za izradu elektroispredanih nosača	8
2.1.3. Sintetski polimeri - polikaprolakton.....	10
2.2. Antibiotik u terapiji oka.....	11
2.3. Zahtjevi kod izrade elektroispredanih nosača.....	12
2.3.1. Elektroispredeni nosači u terapiji oka.....	12
2.4. 3D printanje ili trodimenzionalni ispis.....	14
2.4.1. Primjena tehnologije 3D printanja	17
2.5. Izrada staničnih nosača kombinacijom elektroispredanja i 3D printanja.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Materijali	20
3.2. Metoda rada	20
3.2.1. Priprema polimerne otopine za elektroispredanje	21
3.2.2. Elektroispredanje PCL i PCL/CFU otopine.....	21
3.2.3. Izrada 3D printanih kolektora	22
3.2.4. Elektroispredanje PCL/CFU otopina na 3D printanim kolektorima.....	24
3.3. Karakterizacija pripremljenih PCL/CFU elektroispredanih materijala	25
3.3.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	25
3.3.2. Određivanje poroznosti	26
3.3.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)	27
3.3.4. Mehanička karakterizacija	27
3.3.5. Praćenje otpuštanja antibiotika	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Morfološke karakteristike elektroispredanih PCL/CFU materijala	30
4.2. Poroznost elektroispredanih PCL/CFU materijala	37

4.3. Toplinska degradacija elektroispređenih PCL/CFU materijala u ovisnosti o koncentraciji antibiotika	38
4.4. Mehanička svojstva elektroispređenih PCL/CFU materijala u ovisnosti o geometriji 3D printanih kolektora i koncentraciji antibiotika	40
4.5. Otpuštanje antibiotika iz elektroispređenih PCL/CFU materijala	45
5. ZAKLJUČAK	47
6. LITERATURA	49
ZAHVALA	53
ŽIVOTOPIS	54

1. UVOD

U svijetu postoji trend velikog ulaganja u istraživanja na polju elektroispređenih nanovlaknastih nosača koja sa svojim odličnim svojstvima igraju značajnu ulogu u uzgoju tkivnih stanica i raznim biomedicinskim liječenjima, a time opravdavaju svoj značaj. Istraživači neprestano dobivaju nova saznanja i razvijaju nove metode poboljšanja ove tehnike za proizvodnju biomedicinskih materijala. Biokompatibilnost i biorazgradljivost kod ovih nosača su važni parametri u regulaciji rasta stanica, prevencije upale i toksičnosti. Vlaknasta struktura, geometrija pora i međusobna povezanost pora, su značajni za vezivanje stanica, migraciju, rast i protok hranjivih tvari. U svrhu poboljšanja stanične adhezije elektroispređanje se provodi na modificiranih kolektorima specijalne geometrije ili naknadnom kemijskom modifikacijom površine elektroispređenog nosača. Jedna od mogućnosti izrade kolektora specijalne geometrije je i tehnologija 3D printanja koja omogućava brzu i jednostavnu izradu predmeta najčešće iz plastike, tj. polimera poput: polilaktida (PLA), akrilonitril butadien stirena (ABS), polivinil alkohola (PVA) i sl. 3D printanjem izrađuju se predmeti u jednom koraku bez naknadnog spajanja dijelova.

Elektroispređeni materijali su se pokazali kao dobri kandidati za uzgoj tkivnih stanica odnosno kao odgovarajuća alternativa u tkivnom inženjerstvu u odnosu na najčešće korištene prirodne nosače. Nanovlaknasta struktura je jako slična strukturi izvanstaničnog okruženja, velika poroznost i povezanost pora, kao i sama nanovlakna omogućuju prijenos kisika, hranjivih tvari, te odvoz tekućina. Jedan od izazova u izradi elektroispređenih nosača je problem infiltracije stanica u dublje slojeve nosača. To se može postići izradom nosača sa strukturom izgrađenom od nanovlakana i mikropora. Nanovlakna će omogućiti više vezivna mjesta za stanice, a mikropore će omogućiti prodor stanica u dublje slojeve, te u konačnici pridonijeti rastu novog tkiva. U regeneraciji svakako pomažu i dodatci koji se najčešće dodaju polimerima tijekom elektroispređanja (npr. biološke komponente i sl.), dok odabir sirovine svakako mora zadovoljiti i mehaničke kriterije nosača, odnosno nanovlaknasta struktura mora se oduprijeti silama rasta novog tkiva.

U ovom radu provedeno je istraživanje na ciljano izrađenim nosačima, a izrađeni primjenom postupka elektroispređanja u kombinaciji sa tehnikom 3D printanja.

1.1. Ciljevi rada

Glavni cilj ovog rada je izrada nanovlaknastih materijala kombinacijom tehnike elektroispredanja i 3D printanja. Kako bi se izradili materijali sa ciljanom topografijom površine, elektroispredanje se provodi na 3D printanim kolektorima specijalne geometrije. Tako izrađeni materijali primjenjuju se kao nosači za uzgoj tkivnih stanica, pri čemu se topografija njihove površine dizajnira u skladu s dimenzijama i vrstom tkivnih stanica. Ciljana topografija nosača pospješuje adheziju, te daljnju kolonizaciju stanica u unutarnje slojeve nosača. Uz dizajna odgovarajuće fizičke strukture drugi cilj rada odnosi se na izradu materijala s antibakterijskim svojstvom, tj. dodatak antibiotika u polimer tijekom elektroispredanja. Odabrani antibiotik koristi se kao terapija kod regeneracije oka nakon operacije. Specifični ciljevi ovog rada odnose se na karakterizaciju elektroispredanih nosača u ovisnosti o topografiji površine odnosno geometriji 3D printanih kolektora, te u ovisnosti o količini dodanog antibiotika. Pri tome ispitivana svojstva uključuju:

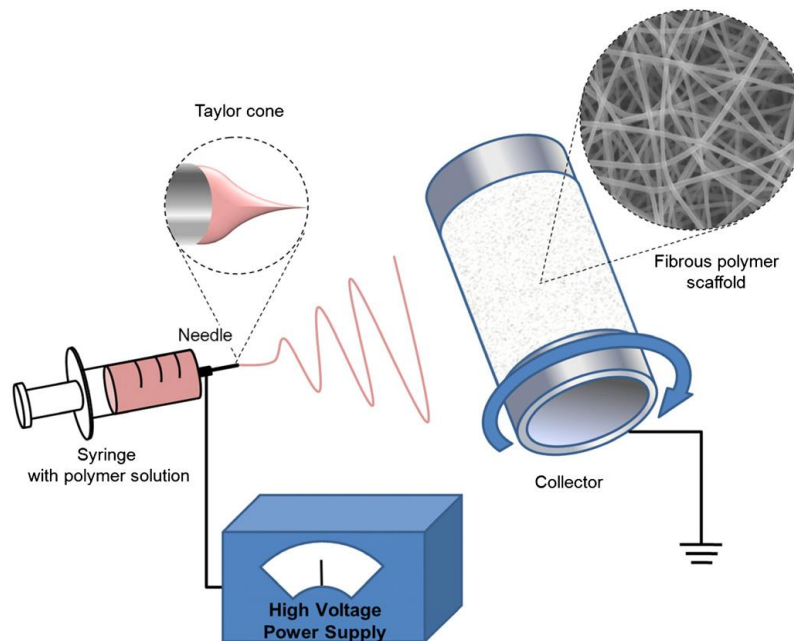
- određivanje morfologije elektroispredanih nosača, odnosno promjer vlakana, promjer deformacija ili grudica, površina pora kao i izgled površine vlakana odnosno površine elektroispredanog nosača,
- određivanje ukupne poroznosti elektroispredanih nosača,
- određivanje gubitka mase, te brzine degradacije, u funkciji temperature, a ovisno o količini antibiotika u elektroispredanom nosaču,
- određivanje mehaničkog ponašanja materijala tijekom vlačnog testa,
- praćenje otpuštanja antibiotika tijekom određenog perioda koji odgovara kontroliranoj terapiji oka nakon operacije.

2. O TEHNOLOGIJI ELEKTROISPREDANJA I 3D PRINTANJA

2.1. Elektroispredanje

Tehnikom elektroispredanja proizvode se nanovlakna dovođenjem mlaza polimerne otopine u električno polje koji se stanjuje, destabilizira i naposljetku oblikuje u ultra tanke filamente pod utjecajem elektrostatskih sila. U 21. stoljeću tehnika elektroispredanja postala je najpopularnija tehnika proizvodnje nanovlakana, zbog jednostavne izvedbe uređaja, mogućnosti izbora materijala, kontrole morfologije vlakana, relativno visoke stope proizvodnje (u novije vrijeme), što je rezultiralo time da se znanstvenici raznih profila bave ovom tehnikom diljem svijeta [1].

Uređaj za elektroispredanje sastoji se od tri glavne komponente: izvora visokog napona, pumpe sa špricom (s iglom ravnog vrha - mlaznica) u kojoj se nalazi polimerna otopina, te uzemljenog kolektora vlakana (najčešće metalna ploča ili valjak), slika 2.1.1. [1].



SI. 2.1.1. Uređaj za elektroispredanje [2].

Procesni parametri koji utječu na veličinu promjera elektroispredenih vlakana su:

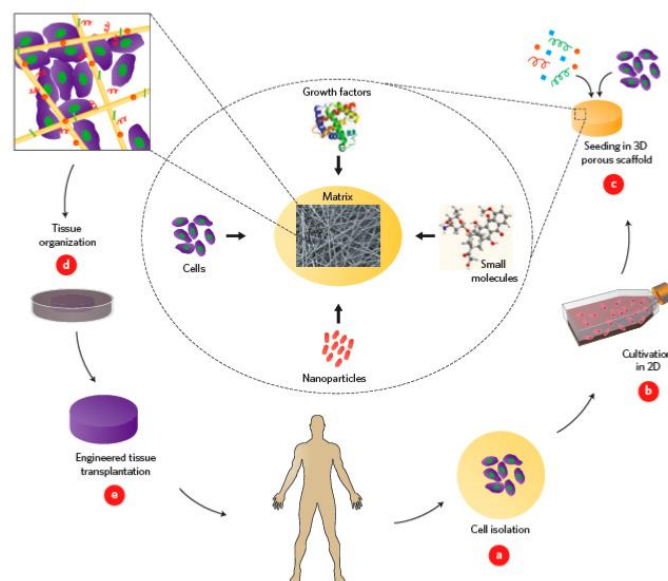
- električni napon
- brzina protoka polimerne otopine
- udaljenost kolektora od mlaznice (vrha igle)
- vrijeme elektroispredanja [1].

Uz procesnih parametara vrlo bitna su i svojstva polimerne otopine: koncentracija, viskoznost, vodljivost, površinska napetost, kao i karakteristike otapala, te relativna molekulska masa polimera. Naposljetku se mogu uzeti u obzir i uvjeti okoline: relativna vlažnost zraka, temperatura i brzina strujanja zraka [1]. Kolektori koji se koriste u elektroispredanju najčešće su pokriveni aluminijskom folijom zbog lakšeg prikupljanja nanovlaknastih materijala, a također kao kolektori mogu se koristiti i: elektrovodljivi papir, elektrovodljive tkanine, igle, perforirani valjci, koagulacijske kupelji, 3D printani kolektori i sl. [3]. Prednosti elektroispredanih vlakana u odnosu na konvencionalna vlakna su: veliki omjer površine i volumena, visoki postotak poroznosti, te mogućnosti kontrole konfiguracije vlakana prema primjeni [1].

2.1.1. Elektroispredanje u tkivnom inženjerstvu

Tkivno inženjerstvo je interdisciplinarno područje koje obuhvaća znanje i vještine iz područja stanične biologije, medicine, znanosti o biomaterijalima i iz bioinženjerstva. U tkivnom inženjerstvu učinkovit uzgoj tkivnih stanica stoga i održiv biološki proizvod zahtjeva sustavan bioinženjerski pristup. Osnovni pristup u tkivnom inženjerstvu je primjena prirodnih ili umjetnih nosača za privremeno ili trajno podupiranje tkivnih stanica, kako bi se omogućio njihov rast, proliferaciju i infiltraciju, te kako bi novonastalo tkivo preuzelo strukturu i funkciju oboljelog dijela tkiva [4].

Na slici 2.1.1.1. dan je primjer koncepta tkivnog inženjerstva zasijavanjem stanica na elektroispredanom biomaterijalu.



Sl. 2.1.1.1. Shema tkivnog inženjerstva [5].

Najprije se stanice izoliraju iz određenog ljudskog tkiva (a), uzgajaju na 2D površine radi povećanja broja (b), te nakon toga zasijavaju na elektroispredenim uz dodatak faktora rasta, nanočestica i sl. (c), potom se nosači prenose u bioreaktore za optimalne uvjete kod organizacije tkiva (d), da bi se kasnije mogla transplantirati na mjestu oštećenog tkiva (e) [5].

Nekih od tehnika izrade nosača koja se koriste u tkivnom inženjerstvu dane su u tablici 2.1.1.1., kao i njihove prednosti i nedostaci. U usporedbi s tehnikom molekulskog samoudruživanja ili faznog razdvajanja, elektroispredanje omogućava jednostavniju izvedbu, veliku specifičnu površinu, kontrolu morfologije i orijentacije vlakana, veliki omjer površine i volumena, a u novije vrijeme i uređaju s većom brzinom proizvodnje nosača [3].

Tab. 2.1.1.1. Tehnike izrade nosača za tkivno inženjerstvo [3].

Tehnike	Prednosti	Nedostaci
Elektroispredanje	Jednostavna izvedba, ultrafina vlakna, velika specifična površina, kontrola morfologije i orijentacije vlakana, veliki omjer površine i volumena.	Mala produktivnost kod laboratorijske izvedbe.
Fazno razdvajanje	Relativno jednostavna izvedba, istovremena prisutnost nano i makro arhitekture.	Relativno dug i složen postupak izrade.
Molekulsko samoudruživanje	Slojevite i lamelarne strukture; Fleksibilnost sustava.	Vremenski zahtjevna tehnika; Ekonomski neisplativa.

U tablici 2.1.1.2. dani su zahtjevi materijala kod izrade nosača u tkivnom inženjerstvu.

Tab. 2.1.1.2. Zahtjevi materijala za nosače korištene u tkivnom inženjerstvu [6].

Potrebna svojstva	Prednosti
Biokompatibilnost	Imunogenost i netoksičnost
Poroznost	Idealna poroznost $\approx 90\%$ Omogućuje infiltraciju stanica i hranjivih tvari

	Uklanjanje otpada Veća površina za vezanje i proliferaciju stanica
Biorazgradljivost	Privremena struktura za vezivanje i proliferaciju stanica Degradira i stvara se novo tkivo Uklanja potrebu za daljnjom invazivnom operacijom Proizvodi degradacije su netoksični i lako se izlučuju kroz metaboličke putove
Mehanička stabilnost	Stabilnost za lakše rukovanje Podupiranje silama koje se pojavljuju kod rasta tkiva

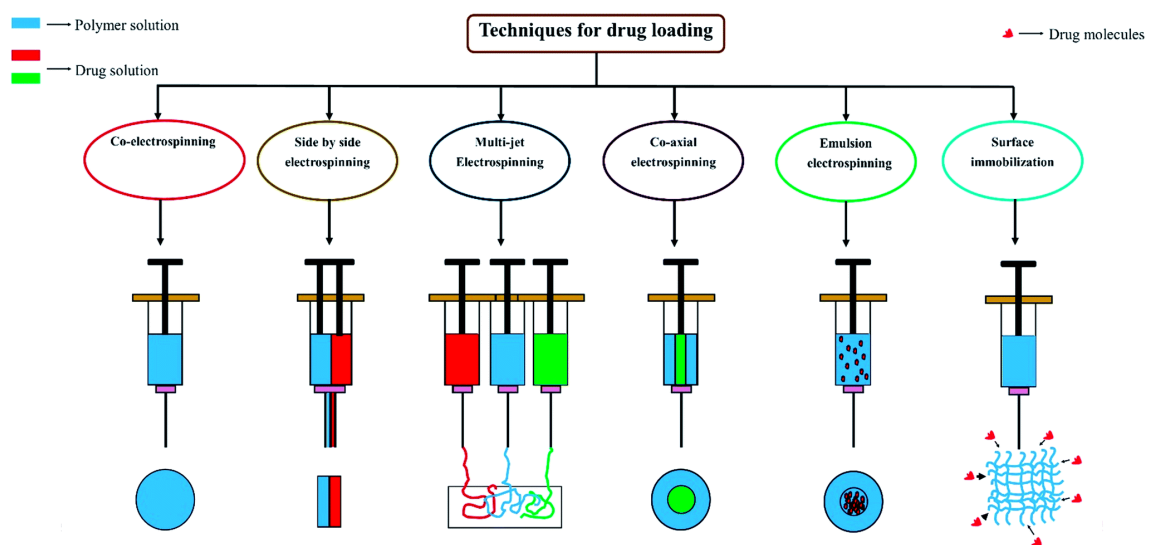
Oblozi za zarastanje rana izrađeni od elektroispredenog biopolimera sadrže razne aktivne spojeve koji su korisni za liječenje rana. Veličina vlakana kreće se od 10 nm do nekoliko mikrometara. S pravim izborom biopolimera koji se koriste za ove vlaknaste materijale, oblozi su u stanju značajno poboljšati zacjeljivanje rana u usporedbi s uobičajenim vlaknastim materijalom, kao što je gaza. Ovi zavoji mogu biti načinjeni tako da sadrže bioaktivne sastojke, kao što su antimikrobni, antibakterijski i protuupalni agensi koji se oslobađaju na ranu i time pojačavaju njeno iscjeljenje/zarastanje [3]. Na slici 2.1.1.2. dan je primjer izrade mikro/nanovlaknastog nosača elektroispredenog iz mješavine PCL-a i kitozana, a kako bi se koristio kao implantat za regeneraciju koštanog tkiva [7].



SI. 2.1.1.2. Primjer izrade i primjene nosača od PCL/kitozan mikro/nanovlakana [7].

Elektroispredeni nanovlaknasti nosači služe i kao sustavi za prijenos lijekova zbog mogućnosti kontrole otpuštanje lijeka u ovisnosti o konfiguraciji vlakna. Otpuštanje farmaceutske doze lijeka može biti brzo, neposredno, odgođeno ili kontinuirano. Elektroispredanjem moguće je u različite polimere inkorporirati male molekule lijeka npr. antitumorski lijek, antibiotike i dr.), biološke komponente (npr. proteini, DNA, siRNA i enzimi), nanočestice koje se koriste u raznim terapijama (npr. Ag, Au, magnetske nanočestice i sl.) [3].

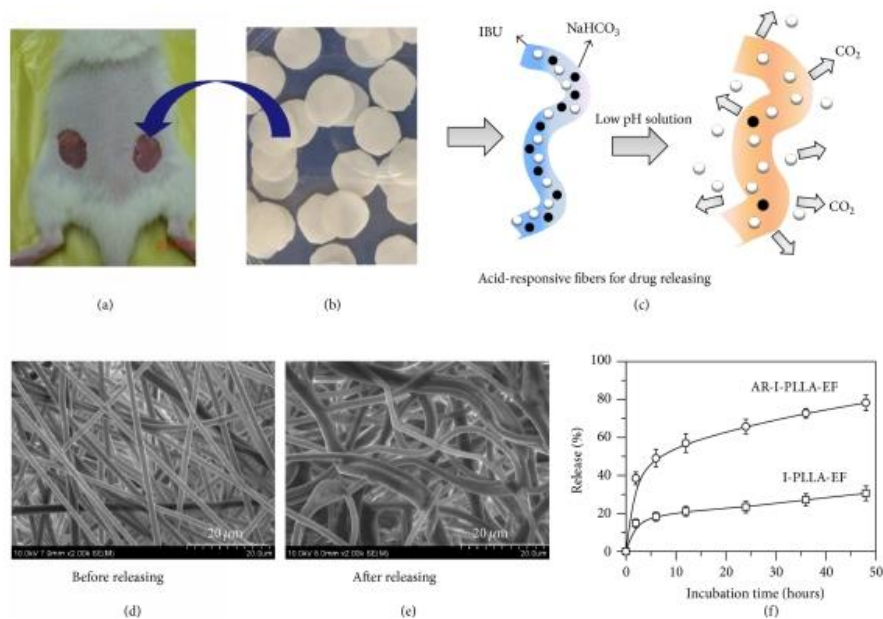
Na slici 2.1.1.3. dani su postupci elektroispredanja za inkorporaciju molekule lijeka u elektroispredena nanovlakna.



SI. 2.1.1.3. Načini inkorporacije lijeka u elektroispredena nanovlakna [8].

Lijekovi se mogu inkorporirati ispredanjem iz mješavine s polimernom matricom, bikomponentnim (otopine su jedna do druge, od kojih jedna u sebi sadrži lijek) elektroispredanjem, trikomponentnim elektroispredanjem i to iz koagulacijske kupelji, ko-aksijalnim elektroispredanjem, ispredanjem iz emulzije ili površinskom imobilizacijom [8]. Veća količina otpuštanja lijeka ili pak stabilno konstantno otpuštanje lijeka ovisi o kompatibilnosti polimera i lijeka, to jest da li se radi o hidrofobnom odnosno hidrofilnom polimeru i lijeku [9].

Također postoje i tzv. pametna elektroispredena nanovlakna koja reagiraju na promjene određenih parametara npr. promjena pH okoline pri čemu dolazi do otpuštanja lijeka, slika 2.1.1.4. To su vlakna elektroispredena iz polimera koji u svojoj strukturi sadrže orto esterske skupine npr. D,L-laktid koji omogućava povećano otpuštanje lijeka u baznom mediju [10].



Sl. 2.1.1.4. Otpuštanje lijeka iz elektroispređenih nanovlakana promjenom pH [10].

2.1.2. Prirodni polimeri za izradu elektroispređenih nosača

Za pripremu nanovlaknastih nosača za uzgoj tkivnih stanica koriste se prirodni polimeri, kao i sintetski polimeri prirodnog porijekla. Prirodni polimeri obično pokazuju bolju biokompatibilnost i nisku imunogenost, u usporedbi sa sintetskim polimerima, a razlog upotrebe je njihova inherentna sposobnost za vezanje stanica jer nose određene sekvence proteina, kao što je RGD. Najpoznatiji prirodni polimeri koji se koriste su: kolagen, fibroin, hialuronska kiselina, fibrinogen, kitozan, hitin, želatinu, škrob i sl., a najčešće se ispredaju u mješavini s umjetnim polimerima. Zasiijane i uzgojene stanice koriste se za regeneraciju mekih i tvrdih tkiva, uključujući: hrskavicu, kožu, kosti, arterijske krvne žile, srce, živce i itd. [3].

Tab. 2.1.2.1. Prirodni polimeri korišteni u elektroispređanju [3].

Polimer	Otopalo	Promjer vlakana (nm)	Primjena	Referenca
Fibroin	mrvlja kiselina	80±40	Nanovlaknasti nosači za zarastanje rana	Min i sur. (2004)

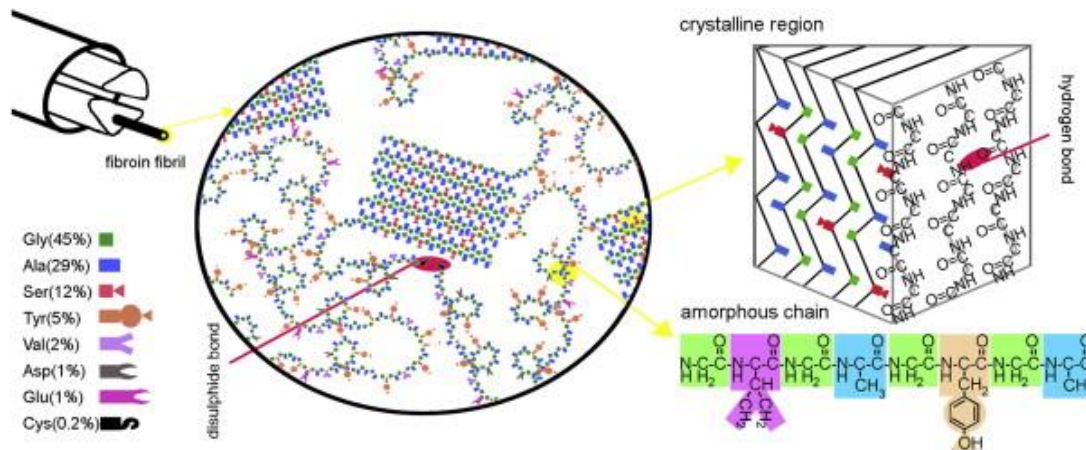
PCL/želatina	trifluor etilen	470±120	zarastanje rana	Chong 2007
Fibroin/PEO	voda	590±60	tkivni inženjering za ozljede koštanog sustava	Li i sur. (2006)
Fibroin/kitozan	mravlja kiselina	320±80	oblozi za rane	Park i sur. (2004)
Fibroin	voda	700±50	nosači za tkivni inženjering	Jin HJ i sur.(2004)
Hitin	heksafluor- 2-propanol	120±60	zarastanje rana	Byung-MooMin i sur. (2004)

Od sintetskih ali biokompatibilnih i biorazgradivih polimera najčešće korišteni polimeri su: polilaktid (PLA), polikaprolakton (PCL), polietilen oksid (PEO), polivinil alkohol (PVA), njihovi kopolimeri i sl. U tablici 2.1.2.1. dani su primjeri korištenih prirodnih polimera, otapala, dobiveni projem elektroispređenih vlakana, kao i njihova primjena.

Fibroin je protein koji se dobiva iz filamenta svile. Fibroinski protein se sastoji od slojeva antiparalnih beta-ploča. Njegova primarna struktura se uglavnom sastoji od ponavljajuće aminokiselinske sekvence (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala)_n. Visok sadržaj glicina (i u manjoj meri alanina) omogućava gusto slaganje beta ploča, što doprinosi krutosti strukture svile koja se ne može istegnuti. Kombinacija ukočenosti i žilavosti omogućava primjenu ovog materijala u nekoliko područja, uključujući biomedicinu i proizvodnju tekstila. Poznato je da fibroin može da postoji u tri strukture, svila I, II, i III. Svila I je prirodna forma fibroina, koja se formira u žlijezdama *Bombyx mori*. Svila II se odnosi na uređenje molekula fibroina u upređenoj svili, koja ima veću čvrstoću, te stoga nalazi mnoštvo komercijalnih primjena. Svila III je novootkrivena struktura fibroina. Svila III se formira prvenstveno u rastvorima fibroina na kontaktnim mjestima (npr. voda-ulje) [11]. Na slici 2.1.2.1. dan je prikaz fibrila fibroina, tj. njegovu strukturu uključujući kristalno i amorfno područje.

Hitin je rožnata tvar koja čini vanjski oklop člankonožaca, a nalazi se i u staničnim stijenkama gljiva i nekih alga. To je polisaharid sastavljen od N-acetilglukozamina. Po prostornoj strukturi hitin je životinjski analog celuloze, od koje se razlikuje jedino po

tome što umjesto –OH skupine na drugom ugljikovu atomu glukoze ima skupinu –NH–CO–CH₃. Hitin proizvodi organizme poput protozoa, gljivica, artropoda i nematoda koji su često patogeni u drugim vrstama. Hitin se depolimerizira gama zračenjem kako bi se poboljšala njegova topljivost [12].

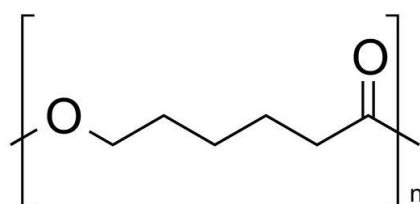


SI. 2.1.2.1. Fibril fibroina [13].

2.1.3. Sintetski polimeri - polikaprolakton

Sintetski polimeri su materijali velike molekulske mase koji nastaju polimerizacijom ili spajanjem malih molekula (monomera). Relativna molekularna masa polimera je uglavnom veća od 10 000, a ovisi o stupnju polimerizacije ili brojem monomera. Polimeri s malim stupnjem polimerizacije nazivaju se oligomeri. U slučaju jednakih monomera radi se o homopolimerima, dok u slučaju dvije do tri vrste monomera radi se o kopolimerima. Osim ravnolančanih makromolekula mogu se pojaviti i bočne lance, koji mogu biti i međusobno povezane poprečnim vezama, te tako tvoreći trodimenzijske umrežene strukture [14].

Polikaprolakton (PCL) je biorazgradivi poliester s niskom točkom taljenja od oko 60°C i temperaturi staklišta od oko -60°C. Strukturna formula polikaprolaktona dana je na slici 2.1.3.1.



SI. 2.1.3.1. Strukturna formula polikaprolaktona.

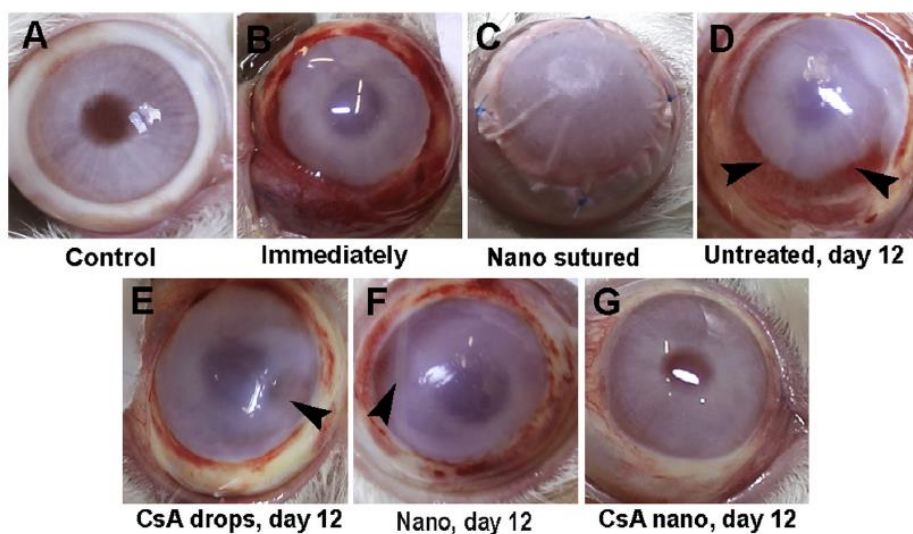
2.3. Zahtjevi kod izrade nosača za uzgoj tkivnih stanica

Bolesti, ozljeda i trauma mogu dovesti do oštećenja i degeneracije tkiva u ljudskom tijelu, što zahtijeva tretmane koji olakšavaju njihovu regeneraciju ili zamjenu. Koncept tkivnog inženjerstva formaliziran je 1993. godine kada su *Langer* i *Vacanti* objavili povijesnu prekretnicu u časopisu *Science*, gdje su detaljno opisane karakteristike i primjene biorazgradivih trodimenzionalnih (3D) nosača u svrhu regeneracije tkiva ili organa. Zahtjevi kod izrade 3D nosača se odnose na njihovu arhitekturu, biokompatibilnost, bioaktivnost i mehanička svojstva. Nosači moraju biti vrlo porozni, te imati dobro povezane mreže pora kao i prikladnu veličinu pora za migraciju i infiltraciju stanica u dublje slojeve [18, 19]. Poroznost ili pore su vrlo bitne kako bi se omogućila vaskularizacija, formiranje novog tkiva, kao i njegovo oblikovanje. Porozna struktura je također bitna za učinkoviti prijenos nutrijenata i metaboličkih produkata, ali poroznost kao i korišteni biomaterijali svakako ne bi smjeli kompromitirati mehaničku stabilnost. Korišteni biomaterijali moraju imati biorazgradivost koja odgovara brzini formiranja novog tkiva. Biokompatibilnost materijala je također od izuzetne važnosti kako bi se omogućila adhezija stanica, njihov rast i diferencijacija tijekom *in vitro* zasijavana i *in vivo* implantacije. Kod nosača je poželjna i bioaktivnost kako bi se mogla uspostaviti interakcija sa stanicama, a to se može postići dodatkom staničnih liganada ili nosač može poslužiti kao sustav za prijenos staničnih faktora rasta koji pospješuju regeneraciju tkiva. U ovom slučaju biomaterijali moraju biti i kompatibilni s ugrađenim biomolekulama. Adekvatna mehanička svojstva, te stabilnost oblika su također bitni parametri kod regeneracije tkiva i oni moraju biti u skladu s vrstom zasijanih stanica odnosno tkiva [19, 20]. Neka istraživanja su pokazala da su stanice osjetljive na krutost nosača, te ovisno o vrsti stanice iste pokazuju i različitu morfologiju i adheziju, npr. ovisno da li se radi o epitelnim stanicama, fibroblastima, stanicama mišića ili nervnog sustava [21].

2.3.1. Elektrospredeni nosači u terapiji oka

Kemijska (lužinom i kiselinom) ozljeda konjunktive i rožnice je opasan slučaj te zahtijeva brzu intervenciju. Kemijske ozljede oka mogu prouzročiti velika oštećenja očne površine i prednjeg dijela, što dovodi do oštećenja vida. Rana dijagnoza i liječenje osiguravaju najbolji mogući ishod za ovo potencijalno zasljepljujuće stanje.

Da bi se suzbila upala i neovaskularizacija rožnice kunića ozlijeđenom lužinom koriste se elektroispredena PLA nanovlakna napunjena ciklosporinom A (CsA) nanešena na površinu očiju ozlijeđene lužinom (0.25 N -NaOH). Ciklosporin je snažno imunosupresivno sredstvo, koje se koristi u transplantaciji ljudskih organa i koštane srži kako bi se spriječilo odbacivanje presatka, te u slučaju bolesti presatka protiv primatelja. CsA kapi za oči imaju nedovoljnu učinkovitost, jer se brzo isperu s površine oka, te je kontakt CsA s oštećenom rožnicom ograničen. Stoga pristup s elektroisprednim nanovlaknima koji su sebi inkorporiraju CsA može predstavljati učinkovit alternativni način terapije kemijskih opekotina rožnice [22].



Sl. 2.3.1.1. Fotografije zdravih i tretiranih rožnica. Opalescencija rožnice vidljiva je nakon ozljede. Usporedba tretiranja rožnice sa CsA kapima i nanovlaknima sa i bez CsA nakon 12 dana od ozljede [22].

Kod tretiranja tkiva oka vrlo bitan parametar kod izrade elektroisprednih nosača je njihova transparentnost. Također transparentnost igra ključnu ulogu tijekom rekonstruktivne kirurgije živaca. Istraživanje je pokazalo da prolaz svjetline ovisi o orijentaciji nanovlakana u elektroisprednom nosaču. Paralelno orijentirana vlakna daju bolju transparentnost od elektroisprednih vlakana koja su nasumično orijentirana. Istraživanje je **pokazalo** da nanovlaknasti materijal s paralelnim vlaknima ima transparentnost dvostruko veću od onog s nasumično orijentiranim vlaknima. Proizvedeni umjetni živčani kanali pokazali su visoku prozirnost gdje je unutarnja površina živčanog kanala bila prekrivena paralelnim elektroisprednim vlaknima koji su pokazali poboljšanu proliferaciju neuronskih stanica [23].

2.4. 3D printanje ili trodimenzionalni ispis

Tehnologija 3D printanja postaje dostupna kasnih 1980-tih, kada je nosila naziv brza izrada prototipova (engl. *rapid prototyping*) gdje se model izrađivao na temelju 3D CAD podataka ili računalne tomografije. Prva prijava patenta za RP tehnologiju došla je od Hideo Kodame s Nagoya istraživačkog instituta koji je napravio funkcionalni sustav brzog prototipa pomoću fotopolimera. Do novog važnog patenta za povijest 3D printanja čekalo se do 1986., kada je napravljen prvi patent za uređaj stereolitografije. Tijekom 90-ih i ranih 00-ih uveden je niz novih tehnologija, koje su bile usmjerene u potpunosti na industrijsku primjenu i više manje su se svodili u velikoj mjeri na postupke izrade prototipova. Ubrzo je predstavljeno više naprednih tehnologija te je uspostavljena nova terminologija, proces brze izrade lijevanjem (engl. *rapid casting*), brze izrade alata (engl. *rapid tooling*) i brze izrade proizvoda (engl. *rapid manufacturing*). Engleski inženjer Adrian Bowyer predstavio je 2004. godine svijetu svoj *RepRap* koncept sa slobodnim softverom koji koristi varijantu modeliranja taložnim srašćivanjem, aditivne proizvodne tehnologije [24].

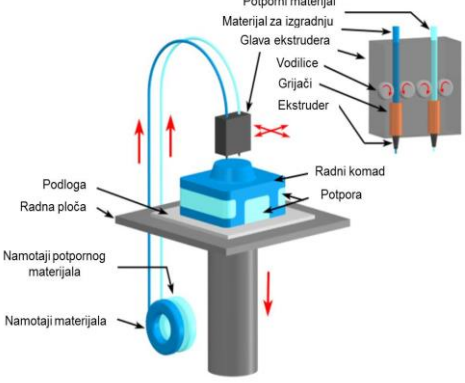
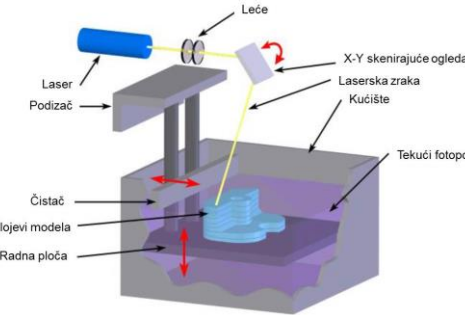
Tržište je 2007. godine, prvi put ugledao 3D printer ispod 10,000 \$ napravljen od tvrtke 3D Systems, ali nikad nije postigao uspjeh kakav je trebao. U to doba među inženjerima industrije mogućnost proizvodnje 3D pisača ispod 5000 \$ bilo je ravno pronalasku kamena mudraca, i spuštanje cijene mnogi su vidjeli kao ključ za otvaranje tehnologije 3D printera za široku publiku. Sve do početka 2009. nije postojao komercijalno dostupan 3D printer baziran na *RepRap* konceptu, a onda je došao *BfB RapMan* 3D printer i sve promijenio. 3D printeri su postali u drugom desetljeću 21. stoljeća sve više precizniji i iskorištavaju mogućnosti niske cijene, i sve su više bili integrirani u različite inovacije i proizvodne procese. Tehnologija se i dalje poboljšava na razne načine, od finoće detalja koje stroj može ispisati do vremena potrebnog za čišćenje i završetak objekta kada je ispis dovršen. Procesu su sve brži, materijali i oprema su sve jeftiniji i raznovrsniji, uključujući metale i keramiku. Strojevi za 3D printanje sada su u rasponu od veličine malog automobila do veličine mikrovalne pećnice [24]. 3D printanje tehnika je brze izrade prototipa kojim se uređajima zasnovanima na patentiranoj 3D tehnologiji „ispisuju”, tj. direktno iz 3D CAD programa izrađuju fizički predmeti u prostoru. Glavna je prednost 3D printanja njegova brzina i jednostavnost, ali i mogućnost izrade predmeta od kombinacije različitih materijala, bez potrebe za spajanjem [25].

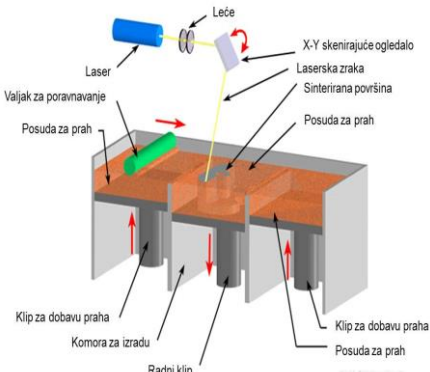
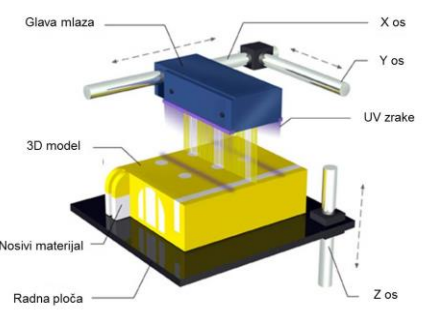
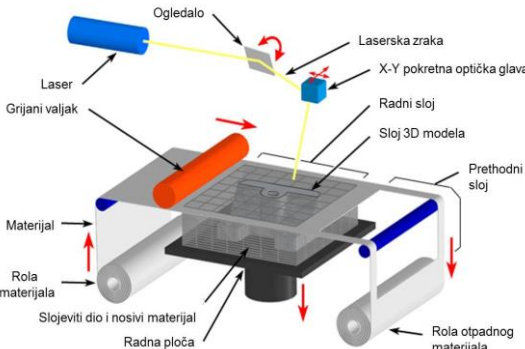
Kod 3D printanja najčešće se upotrebljavaju printeri koji rade na principu:

- a) taložnog srašćivanja (engl. *Fused Deposition Modeling*) – 3D FDM
- b) stereolitografije (engl. *Stereolithography*) – 3D SLA, SL,
- c) selektivnog laserskog srašćivanja (engl. *Selective Laser Sintering*) – 3D SLS
- d) PolyJet postupka (engl. *PolyJet*)
- e) laminirane objektne proizvodnje (engl. *Laminated Object Manufacturing*) – LOM [25].

3D printanje omogućuje kreiranje kompleksnih modela s tankim stijenkama te složenim unutarnjim strukturama. Najčešće se koriste ove dvije tehnologije: Selektivno lasersko srašćivanje (SLS) i Taložno srašćivanje (FDM). U literaturi se navodi i naziv proizvodnja topljenim filamentom (FFF) što je zapravo jedno te isto kao i FDM, ali se koristi da bi se izbjegli problemi oko vlasništva žiga za izraz „modeliranje taložnim srašćivanjem“ (FDM). U tablici 2.4.1. dane su vrste 3D printera koji rade prema gore navedenim principima [25].

Tab. 2.4.1. Vrste 3D printera [25-27].

<p style="text-align: center;">Taložno srašćivanje</p> 	<p>Naslojavanje polimera (sloj na slojem) koji se tali i prolazi kroz mlaznicu promjera od najmanje 0,1 mm. Glava mlaznice giba se u smjeru X i Y osi, dok se radna površina giba po Z-osi. Debljina sloja je od 50 do 762 μm.</p>
<p style="text-align: center;">Stereolitografija</p> 	<p>Slojevi se kreiraju računalo vođenom laserskom jedinicom, a uslijed ultraljubičastog zračenja, na osvjetljenim mjestima polimerna tekućina prelazi u krutu tvar. Debljina sloja je od 0,05 do 0,15 mm.</p>

<p>Selektivno lasersko srašćivanje</p> 	<p>Softver ovog printera koristi STL datoteke koje se dijele u slojeve. Naslojavanje kod ove tehnologije vrši se pomoću materijala u obliku praša koji se dovodi pomoću rotirajućeg cilindra u komoru za modeliranje. Debljina sloja je od 100 do 150 μm.</p>
<p>PolyJet postupak</p> 	<p>Omogućeno naslojavanje mlaza različitih materijala. Točnost izrade objekata od 0,025-0,05 mm (ProJet) i 0,1-0,3 mm (PolyJet). Stijenke su debljine od 0,6 mm a maksimalne dimenzije objekata od 550 x 400 x 300 mm.</p>
<p>Laminirana objektna proizvodnja</p> 	<p>Omogućuje izradu objekata različite mase, a njihova debljina ovisi o vrsti folije. Izrađeni objekti imaju visoku čvrstoću, te su otporni na agresivne medije i visoke temperature. Debljina sloja je od 76 do 150μm.</p>

Materijali koji se koriste kod 3D printanja dani su u tablici 2.4.2., gotovo sve vrste materijala se mogu 3D printati, od polmera, metala i sl. Prednosti SLA 3D printera uključuju: kontinuirani rad of 24 sata dnevno, visoku rezoluciju, mogućnost izrade objekata u dvije boje, bez ograničenja u geometriji oblika i potpuna automatiziranost. Također postoje i nedostatke poput: ograničenja u korištenju materijala (samo fotopolimeri koji su otrovni u tekućem stanju), slaba mehanička svojstva, naknadna UV obrada objekta, potpore objekata koji se naknadno uklanjaju i moguće deformacije uslijed stezanje fotopolimera. U slučaju SLS 3D printanja izrađeni objekti

imaju bolja mehanička svojstva, te nije potreban potporanj jer višak praha podupire objekat [28].

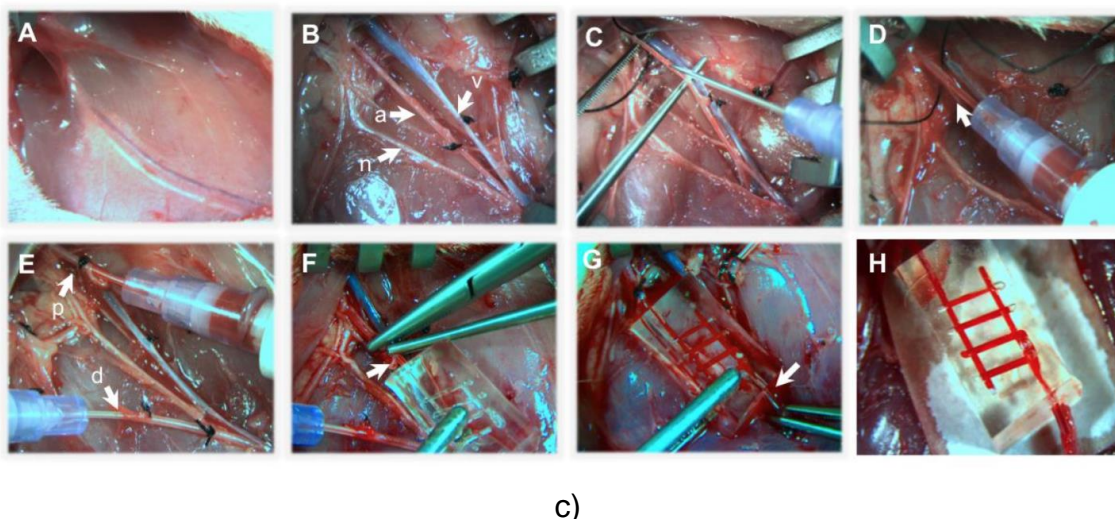
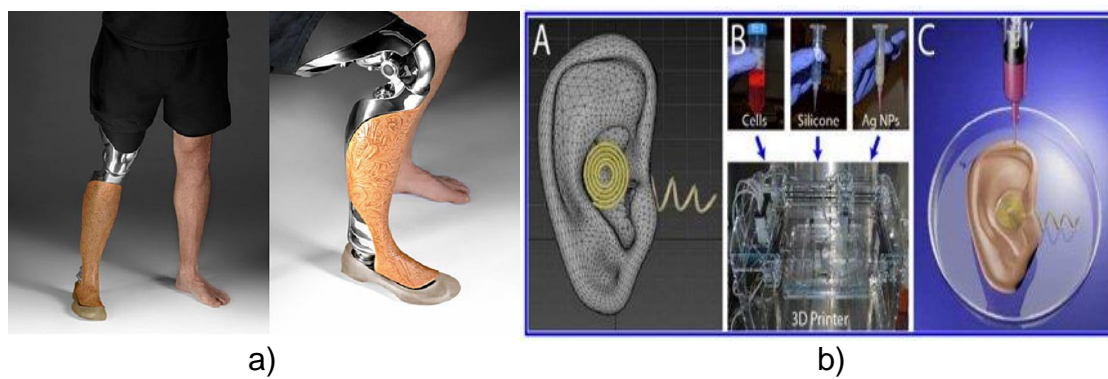
Tab. 2.4.2. Materijali koji se koriste kod 3D printanja [25, 29].

Tip materijala	Proces	Vrsta materijala
Tekući	fotopolimerizacija	fotopolimeri i epoksi smole
	modeliranje taljenjem	termoplastični polimeri, elastomeri i vosak
Praškasti	lasersko sinteriranje	polimeri, keramika, gips, pijesak s vezivom, metali s vezivom
	3D ink-jet	polimerni i metalni prašci
Kruti	laminiranje	polimeri i papir

Izrada 3D modela za 3D printanje provodi se pomoću CAD (engl. *Computer Aided Design*) programa (npr. I-DEAS, Catia, Solidworks) prevođenjem modela u STL formatu ili 3D skenerom objekta. STL format sadrži sklop planarnih trokuta 3D modela. Nakon toga slijedi proces uzastopnog nanošenja slojeva od donjeg do gornjeg. Prednost kod tehnike naslojavanja je izrada kompleksnih oblika koje je gotovo nemoguće izraditi klasičnim metodama [30].

2.4.1. Primjena tehnologije 3D printanja

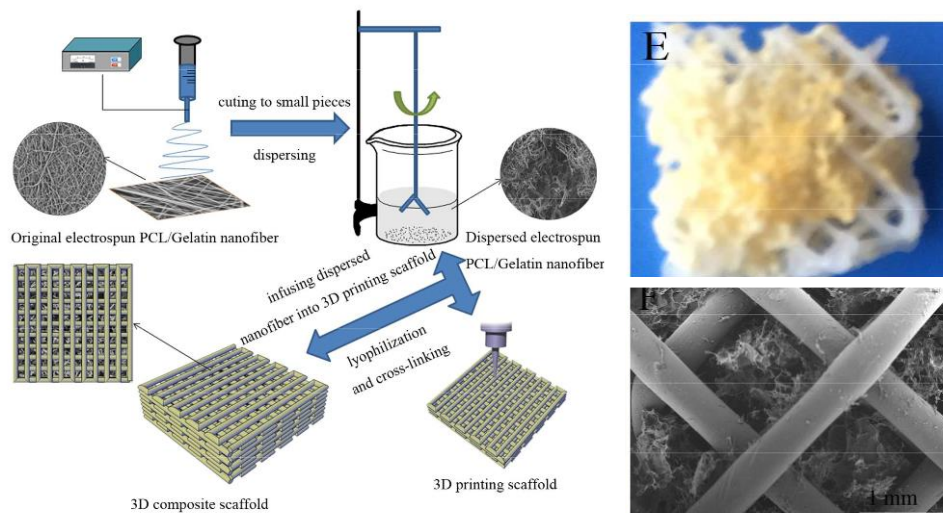
Područja primjene tehnologije 3D printanja su: arhitektura, građevina, industrijski dizajn, automobilska, zrakoplovna, vojna, inženjerska, stomatološka i medicinska industrija, biotehnologija, moda, proizvodnja obuće, obrazovanje itd. [31]. U biomedicini 3D printeri se koriste za proizvodnju: ljudskog tkiva i organa, dijelova tijela (prilagođena protetika), implantati korištenjem biološkog materijala. U farmaceutskoj industriji 3D printani objekti se koriste za razna istraživanja o oblicima doziranja lijekova i sl. Prednosti primjene 3D printanja u biomedicini uključuje: prilagodbu i personalizaciju medicinskih proizvoda, lijekova i opreme, isplativost, povećanu produktivnost itd. [32]. Na slici 2.4.1.1. dani su primjeri 3D printanog uda, 3D printanog uha, kao i 3D printane mreže krvnih žila.



Sl. 2.4.1.1. a) 3D printani protetski ud [33], b) 3D printano bioničko uho [34], c) 3D printana mreža krvnih žila [35].

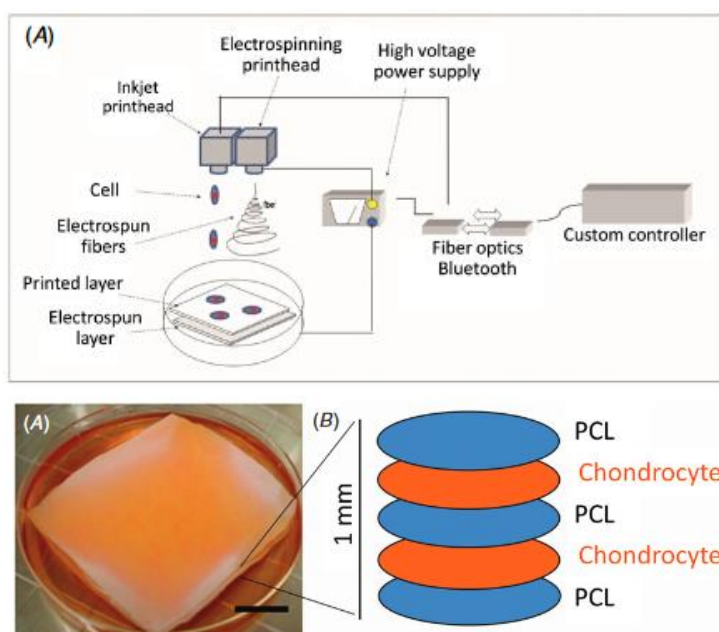
2.5. Izrada staničnih nosača kombinacijom elektroispredanja i 3D printanja

Kada se tehnike elektroispredanja i 3D printanja koriste zasebno, nosači za uzgoj stanica imaju nedostatke poput, nemogućnosti infiltriranja stanica kroz nanoporoznu strukturu elektroispredanih nosača, odnosno nisku rezoluciju 3D printanja zbog čega se ne može postići nanostruktura potrebna za prijenos bioloških tvari. Kako bi se uklonili nedostaci provedena su istraživanja koja kombiniraju obje tehnike kod izrade 3D kompozitnog nosača. 3D nosači izrađeni su utiskivanjem nanovlakna elektroispredena iz mješavine PCL/želatine u 3D printani rešetkasti PCL nosač, slika 2.5.1. Ovi nosači pokazali su poroznu mikrostrukturu od 100-300 μm , te poroznost od $79,32 \pm 8,32 \%$. *In vitro* studija pokazala je da MC3T3-E1 stanice pokazuju bolju proliferaciju i infiltraciju u 3D printani kompozitni nosač u odnosu na PCL printani nosač, a potencijalna primjena je u regeneraciji koštanog tkiva [35].



SI. 2.5.1. Elektrospredanje/3D printanje i elektrospredeni/3D printani nosači [35].

Kombinacija tehnike elektrospredanja s tehnikom 3D printanja je također provedena u svrhu uzastopnog naslojavanja elektrospredenih nanovlakana i printanih tkivnih stanica u svrhu regeneracije hrskavice, slika 2.4.2.1. [36].



SI. 2.4.2. Elektrospredanje/3D printanje i elektrospredeni/3D printani nosači [36].

U ovoj hibridnoj tehnici PCL je korišten za proizvodnju elektrospredenog sloja, dok su zečje hondrocite printane na fibrin/kolagen hidrogel. Hibridni nosač sastajao se od 5 sloja s debljinom od 1 mm. Izrađene hibridne nosače pokazuju poboljšanja biološka i mehanička svojstva [36].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Izrada elektroispredenih materijala, te njihova mehanička karakterizacija provedena je na Zavodu za temeljne prirodne i tehničke znanosti, Laboratorij za elektroispredanje, te Zavodu za materijale, vlakna i ispitivanje tekstila, na Tekstilno-tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. TGA i UV-vis spektrofotometrija, provedeni su na Zavodu za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Elektronsko mikroskopsko snimanje pripremljenih materijala provedeno je u Centru za istraživanje materijala Istarske županije METRIS u Puli. 3D printanje kolektora ciljane geometrije provedeno je na Institutu za temeljne tehničke procese, Češke Akademije znanosti, Prag, Češka.

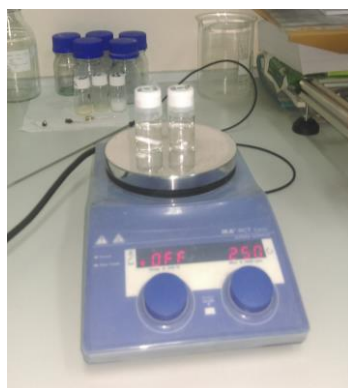
3.1. Materijali

Materijali korišteni u radu su polikaprolakton (PCL) $M_n=80,000$ i otapala: glacijalna octena kiselina i aceton, proizvođača Sigma Aldrich. Korišteni lijek s antibiotskim djelovanjem je CEFUROXIM (CFU), ljubazno poklonjen od suradnika iz Bolnice za oftamologiju – Svjetlost, Zagreb.

3.2. Metoda rada

3.2.1. Priprema polimerne otopine za elektroispredanje

U ovome radu pripravljena je 18 % otopina PCL-a u mješavini otapala, glacijalne octene kiseline i acetona s volumnim omjerom 8:2, slika 3.2.1.1.



SI. 3.2.1.1. Polimerna otopina PCL-a na magnetskoj miješalici.

PCL se najprije otapa u glacijalnoj octenoj kiselini konstantnim miješanjem na magnetskoj miješalici oko 12 sati, nakon otapanja dodaje se aceton i nastavlja se miješanjem uz zagrijavanje na temperaturi od 50 °C kako bi se dobila homogena otopina. Antibiotik CEFUROXIM se dodaje naknadno u koncentraciji od: 5 % i 10 %, na masu polimera, te se nastavlja miješanjem na istoj temperaturi oko 1 sat.

3.2.2. Elektroispredanje PCL i PCL/CFU otopine

Elektroispredanje pripremljenih PCL/CEFUROXIM otopina vrši se na uređaju za elektroispredanje, NT-ESS- 300, NTSEE Co. Ltd. South Korea, slika 3.2.2.1. Uređaj se sastoji od sljedećih komponenti: 1) pumpa i šprica sa iglom ravnog vrha, 2) izvor visokog napona, te 3) rotirajući cilindar, tj. kolektor. U ovom radu korišteni su 3D printani kolektori specijalne geometrije. Uvjeti rada u procesu elektroispredanja su:

- električni napon: 15-17 kV,
- udaljenost od vrha igle do kolektora vlakana: 18 cm,
- brzina protoka polimerne otopine: 1 mL/h.

4 mL polimerne otopine čistog PCL-a ili mješavine s antibiotikom puni se u plastičnu špricu, proizvođača BD plastic, uz iglu ravnog vrha veličine 21G, te se ispreda u vremenu od 4 sata.



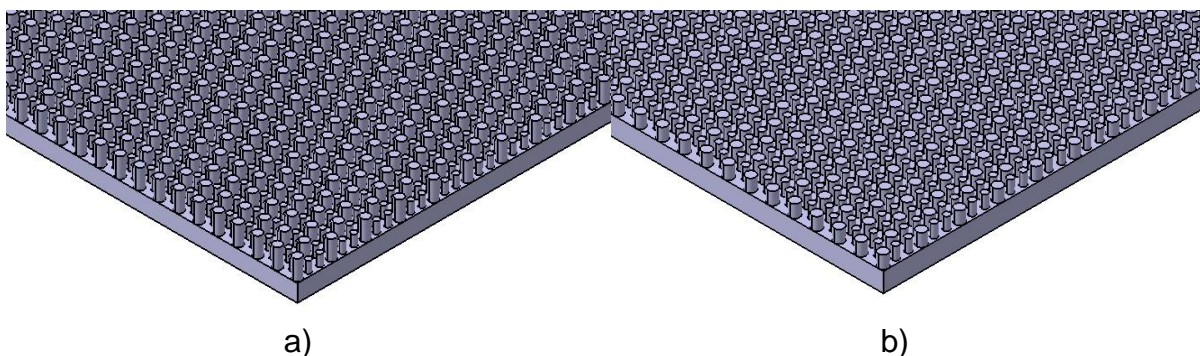
Sl. 3.2.2.1. Uređaj za elektroispredanje – Sveučilišta u Zagrebu, Tekstilno-tehnološki fakultet.

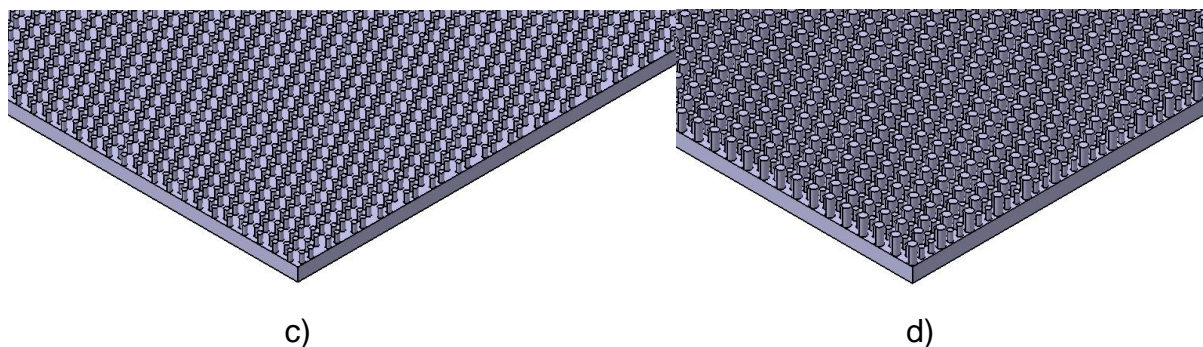
3.2.3. Izrada 3D printanih kolektora

Kolektori specijalne geometrije izrađeni su postupkom 3D printanja na Form 2 3D printeru proizvođača FormLabs, slika 3.2.3.1. 3D printer radi po principu SLA+DLP tehnologije printanja s rezolucijom printanja od 100-25 mikrona. Kao materijal za 3D printanje koristila se epoksi smola, a dobiveni kolektori su iznimno visoke čvrstoće, imaju zaglađene površine i točnost. Za pripremu 3D modela kolektora korišten je program CATIA V5. 3D modeli kolektora prikazani su na slici 3.2.3.2. Osnovna jedinica u geometriji kolektora bio je heksagon ili oblik saća. Kutove heksagona čine valjci promjera od 1 mm. Ukupno je pripremljeno 4 kolektora, od kojih kolektori od 2-3 u centru heksagona imaju i centralni valjak različitih visina. Geometrija kolektora i dimenzije geometrijskih oblika temelji se na potencijalnoj primjeni elektroisprednih materijala za uzgoj tkivnih stanica. Topografija materijala omogućuje poboljšanu adheziju, te daljnju migraciju stanica u dublje slojeve nosača. Dimenzije geometrije kolektora dane su u tablici 3.2.3.1. prema skici osnovne jedinice na slici 3.2.3.3. Kolektori su bili u obliku ploče, dimenzija 95 x 95 mm x 3 mm.

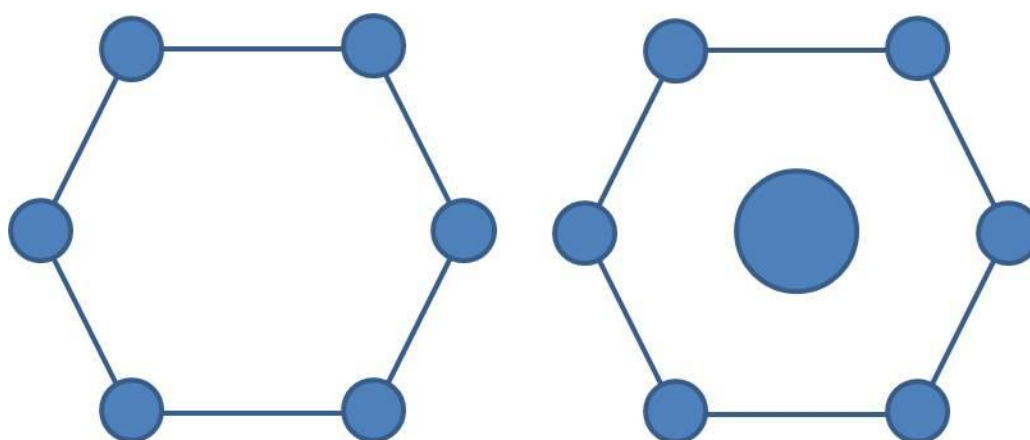


Sl. 3.2.3.1. 3D printer Form 2 [37].





SI. 3.2.3.2. 3D modeli kolektora, kolektor 1 (a), kolektor 2 (b), kolektor 3 (c) i kolektor 4 (d).



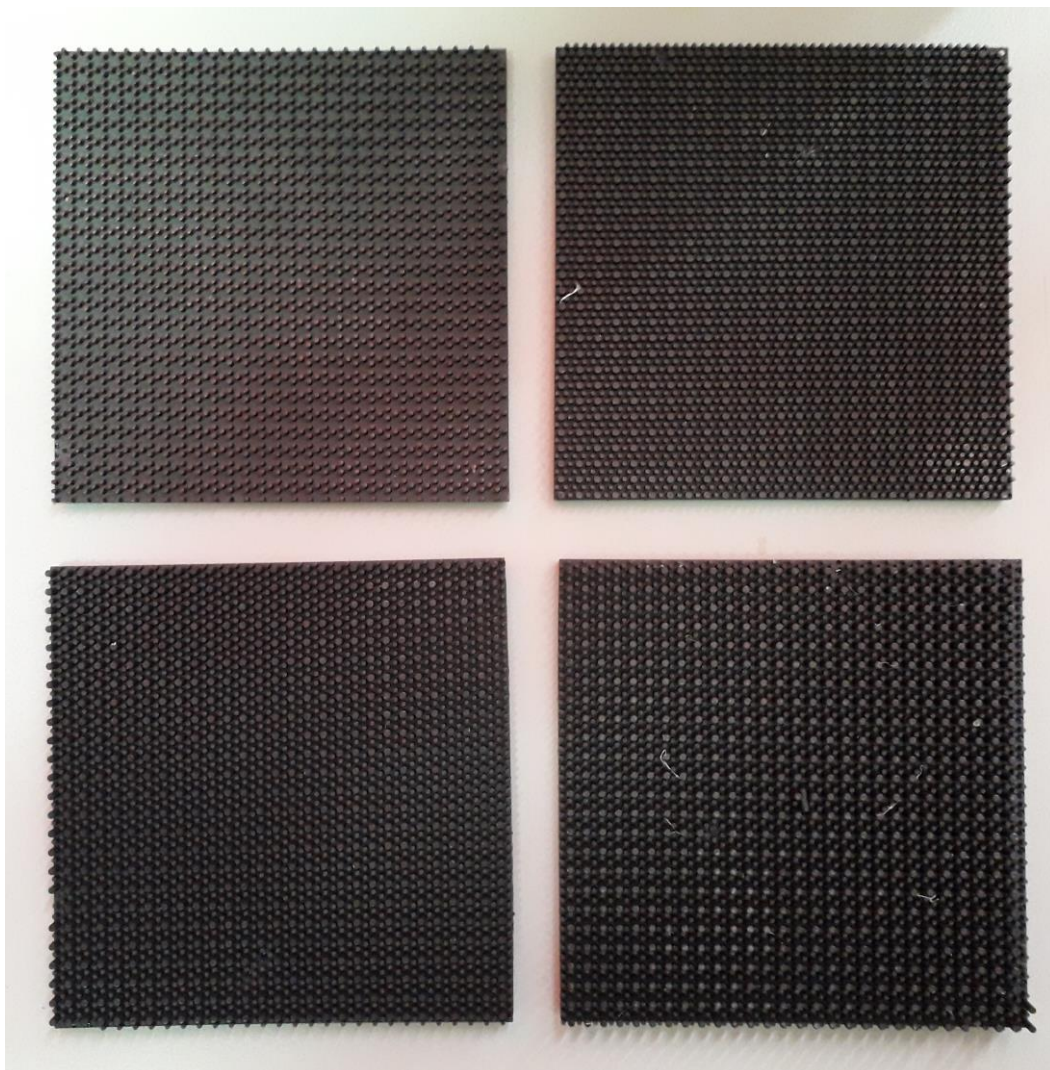
SI. 3.2.3.3. Skice osnovne ponavljajuće jedinice u geometriji kolektora: kolektor 1 (lijevo), kolektor 2-4 (desno).

Tab. 3.2.3.1. Dimenzije geometrije kolektora

Kolektori	Promjer manjeg valjka (mm)	Promjer centralnog valjka (mm)	Visina manjih/centralnog valjaka (mm)	Udaljenost između dva manja susjedna valjka (mm)	Udaljenost između bočnih i donjih/gornjih valjaka (mm)
kolektor 1	1	1,5	2/2	2	1,73
kolektor 2	1	1,5	2/2	2	1,73
kolektor 3	1	1,5	2/3,5	2	1,73
kolektor 4	1	1,5	2/5	2	1,73

3.2.4. Elektroispredanje PCL/CFU otopina na 3D printanim kolektorima

3D printani kolektori prikazani su na slici 3.2.4.1. Prije elektroispredanja pripremljenim kolektorima nanosi se sloj grafita kako bi dobili svojstvo električne vodljivosti, te bi se omogućilo sakupljanje elektroispredenih vlakana. Na slici 3.2.4.2. dana je fotografija elektroispredenog materijala PCL/CFU s topografijom 3D printanog kolektora 1, gdje se na površini jasno vidi geometrija kolektora 1.



SI. 3.2.4.1. 3D printani kolektori s grafitnim slojem.



Sl. 3.2.4.2. Elektrospredeni materijal s topografijom 3D printanog kolektora 1.

3.3. Karakterizacija pripremljenih PCL/CFU elektrospredjenih materijala

3.3.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Za određivanje morfologije vlakana, te izgled površine elektrospredjenih materijala uzorci su snimljeni na skenirajućem elektronskom mikroskopu SEM QUANTA 250, FEI, slika 3.3.1.1.



Sl. 3.3.1.1. SEM mikroskop QUANTA 250, FEI [38].

Prije snimanja uzorci su pripremljeni nanošenjem tankog sloja zlata kako bi postali elektrovodljivi. Uzorci su snimljeni na nekoliko različitih mjesta s uvećanjima od 5000 do 10000 puta. Za određivanje promjera vlakana i promjera deformacija (grudica) po duljini vlakna, te površinu pora izvršena su mjerenja sa SEM slika u programu *ImageJ*. U tu svrhu mjerenje je provedeno na 50-100 nasumično odabranih vlakana i pora, dok je broj deformacija ovisio o pojavi istih po duljini vlakana.

3.3.2. Određivanje poroznosti

Poroznost elektroispredenih materijala određena je računski prema jednadžbi 1. Debljina elektroispredenih materijala određena je pomoću mikrometra: Digi Micrometer Mitutoyo, broj 393-340-30, debljina mjerenja: 0-25 mm, točnost: 0,001 mm, slika 3.3.2.1. Debljina je izražena kao srednja vrijednost na temelju tri mjerenja s nasumičnih mjesta na svakom uzorku. Dimenzije uzoraka su oko 2 x 2 cm, te je za proračun korištena njihova površina, masa, teorijska gustoća PCL-a, te izračunata gustoća mješavine, PCL/CFU, jednadžba 1.

$$P = \left(1 - \frac{m}{A \cdot h \cdot \rho} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je:

P = poroznost elektroispredenog materijala (%),

m = masa elektroispredenog materijala (g)

A = površina elektroispredenog materijala (cm²)

h = debljina elektroispredenog materijala (cm)

ρ = gustoća polimera ili mješavine polimera i antibiotika (g/cm³)



Sl. 3.3.2.1. Debljinomjer – mikrometar.

3.3.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogravimetrijska analiza je metoda termalne analize koja se temelji na mjerenju promjene mase uzorka kao funkcije temperature ili kao funkcije vremena (pri konstantnoj temperaturi). TGA je široko primjenjivana metoda koja se koristi za: karakterizaciju i identifikaciju materijala, sastav uzorka, određivanje udjela organskog otapala u uzorku, određivanje anorganskog udjela u uzorku (pepeo), udio aditiva kao i mehanizam i kinetiku razgradnje. Uređaj za termogravimetrijsku analizu u osnovi se sastoji od precizne vage povezane s posudicom za uzorak koja se nalazi unutar pećnice koja omogućuje precizno zagrijavanje uzorka. TGA instrument može zagrijati uzorak do temperature od 2000°C (ovisno o vrsti peći koju koristi) [39].

Za određivanje promjene mase u ovisnosti o temperaturi, te brzine promjene mase, korišten je TGA analizator Q500 tvrtke TA Instruments, slika 3.3.3.1. Uzorci od oko 10 mg analizirani su u struji dušika uz brzinu zagrijavanja od 10 °C/min, u temperaturnom području od 25°C do 600°C.



SI. 3.3.3.1. TGA analizator Q500, TA Instruments.

3.3.4. Mehanička karakterizacija

Za ispitivanje promjene u mehaničkom ponašanju elektroispredjenih materijala dodatkom CEFUROXIM-a, materijali su ispitivani na dinamometru Tenso Lab 3000 tvrtke Mesdan, S.p.A., Italija, slika 3.3.4.1. Ovaj dinamometar je prvenstveno namijenjen za ispitivanje čvrstoće pređe i plošnih proizvoda. Ima pet mjernih područja:

- 2 daN za elastomerne pređe

- 10 daN za uobičajene pređe
- 100, 1000 i 3000 daN za pređe visoke čvrstoće, konvencionalni i tehnički tekstil.

Instrument je računalno vođen i opremljen softverskim paketom što omogućuje ispitivanja u skladu sa 26 standardiziranih metoda ispitivanja (ISO, EN, ASTM, Marks & Spencer, UNI ...) vlačnih i tlačnih svojstava.

Uvjeti pri vlačnom naprežanju su: brzina istezanja od 20 mm/min, udaljenost između stezaljki od 16 mm, te maksimalna sila od 20 N. Uzorci su testirani 5 puta s dimenzijama od 1x10 cm.



SI. 3.3.4.1. Dinamometar Tenso Lab 3000.

3.3.5. Praćenje otpuštanja antibiotika

U svrhu primjene elektroisprednih PCL/CFU materijala za uzgoj tkivnih stanica, te kontroliranu terapiju oka, neophodno je ispitati i svojstvo otpuštanja ugrađenog antibiotika. U tu svrhu materijali s dimenzijama od 2 x 2 cm stavljaju se u posudice s fiziološkom otopinom (NaCl/H₂O) volumena od 20 mL, te čuvaju na temperaturi od 37 °C kako bi se simulirala prirodna okolina u oku. Otpuštanje antibiotika prati se kontinuirano od 7-10 dana koliko bi trebala trajati terapija pacijenta nakon operacije. Svakih 24 sata iz otopine uzima se uzorak od 1-2 mL, te ispituje UV/Vis spektrofotometrom. Preostala fiziološka otopina nadopunjuje se novom fiziološkom otopinom 1-2 mL kako bi se zadržao konstantan volumen tijekom ispitivanja.

Otpuštanje antibiotika Cefuroxima praćeno je UV/Vis spektrofotometrom Perkin Elmer Lambda EZ 201, slika 3.3.5.1, mjerenjem apsorbancije u vidljivom dijelu spektra, tj. praćenjem promjena valne duljine karakteristićne za fiziološku otopinu (max = 245 nm). Uzorci su snimani u kvarcnim kivetama duljine optičkog puta od 1 cm. Prilikom snimanja apsorbancije, slijepa proba bila je fiziološka otopina. Snimanje spektra odrađeno je pri brzini od 100 nm/min.



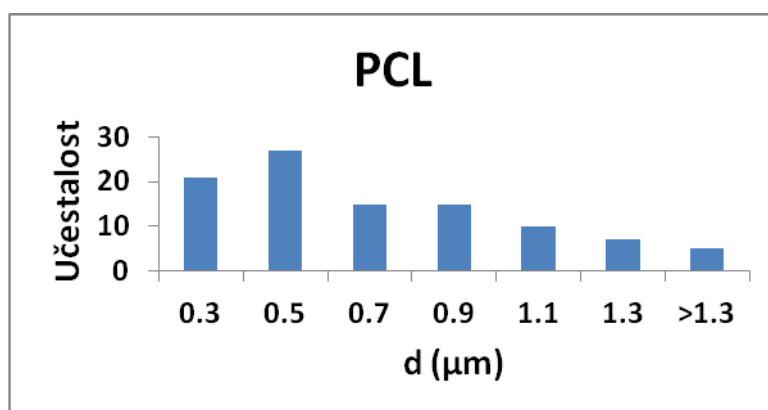
SI.3.3.5.1. UV/Vis spektrofotometar, Perkin Elmer Lambda EZ 201 [40].

4. REZULTATI I RASPRAVA

U svrhu vrednovanja utjecaja topografije površine, te dodatni utjecaj koncentracije antibiotika na svojstva elektroispredenog materijala, najprije je izvršena računalna analiza mikroskopskih slika za određivanje promjera vlakana i deformacija, te površine pora. Poroznost materijala određena je računski na temelju površine, mase i debljine materijala. Utvrđen je utjecaj koncentracije antibiotika na gubitak mase povećanjem temperature, te na ponašanje materijala pri vlačnom testu. Praćeno je i otpuštanje antibiotika iz elektroispredenih materijala u svrhu primjene istih u kontroliranoj terapiji oka.

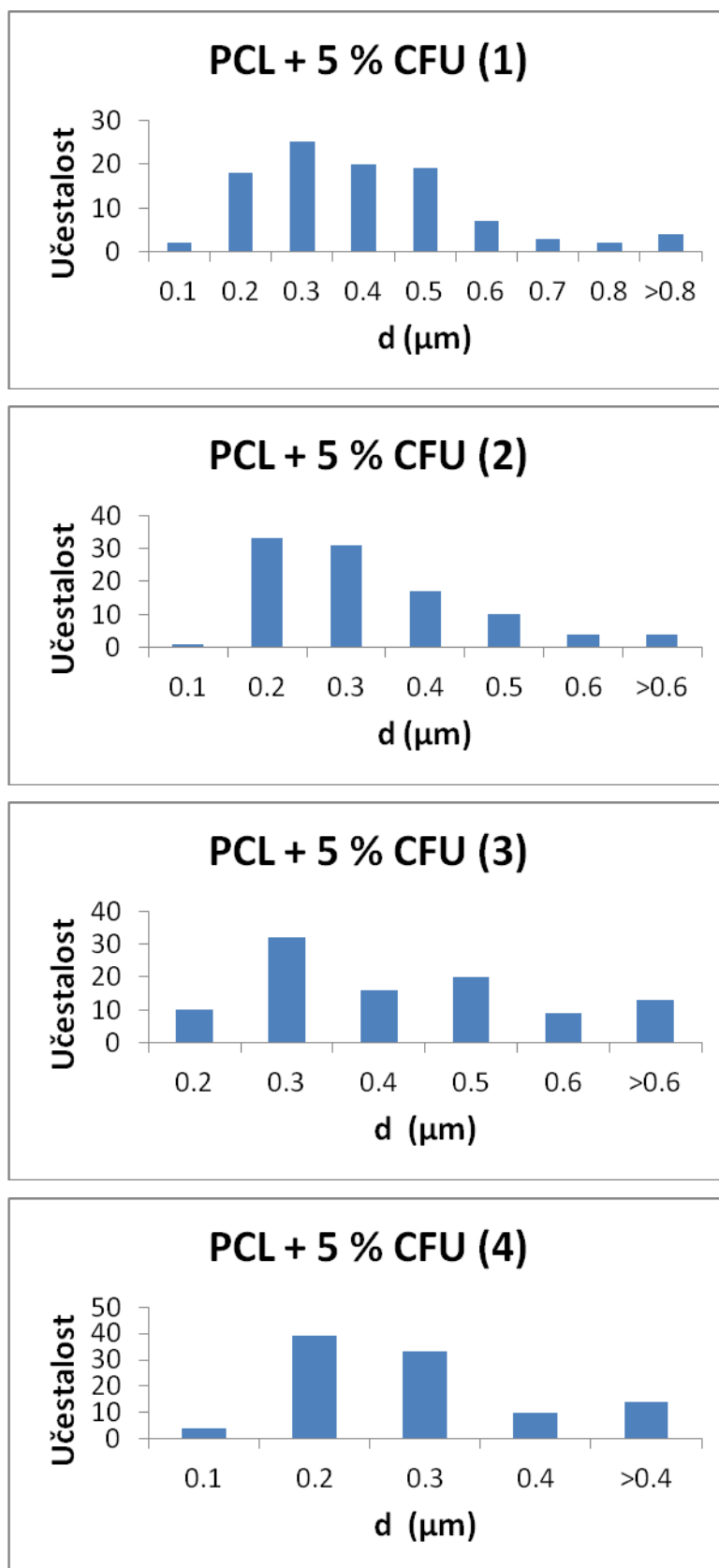
4.1. Morfološke karakteristike elektroispredenih PCL/CFU materijala

U ovom radu uspješno su pripremljeni elektroispredeni materijali iz polikaprolaktona i antibiotika Cefuroxima, a primjenom 3D printanih kolektora posebne geometrije. Potvrđeno je da se kod koncentracija antibiotika od 5 i 10 % uspješno ispredaju nanovlakna, koja se raspoređuju nasumično prema geometriji 3D printanih kolektora, a na način da na punim dijelovima (valjcima) kolektora vlakna se pozicioniraju nasumično kompaktnije, dok na udubljenim dijelovima (između valjaka) vlakna se pozicioniraju nasumično rahlije. Na taj način dobiva se struktura s nanovlaknima i mikroporama. Također je ustanovljeno da nakon duljeg vremena ispredanja reljefnost strukture se smanjuje, pa se geometrija kolektora najjasnije vidi na donjoj strani materijala tj. okrenutoj ka kolektoru. Na slici 4.1.1. dan je histogram distribucije promjera vlakana kod čistog elektroispredenog PCL-a.



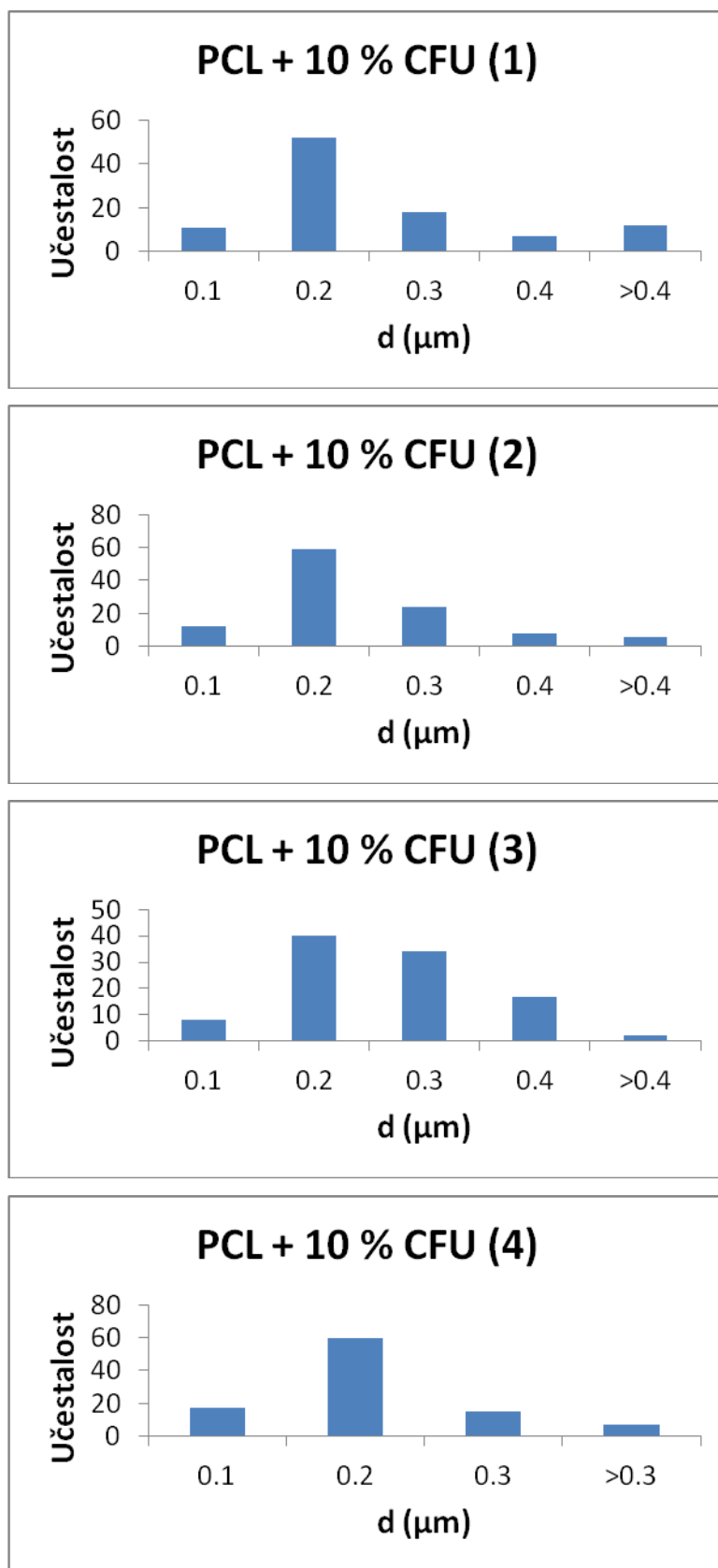
SI. 4.1.1. Distribucija promjera vlakana elektroispredenih PCL materijala.

Na slici 4.1.2. dani su histogrami distribucije promjera vlakana elektroispredjenih PCL/CFU sa 5 % antibiotika.



SI. 4.1.2. Distribucija promjera vlakana elektroispredjenih PCL/ 5 % CFU materijala.

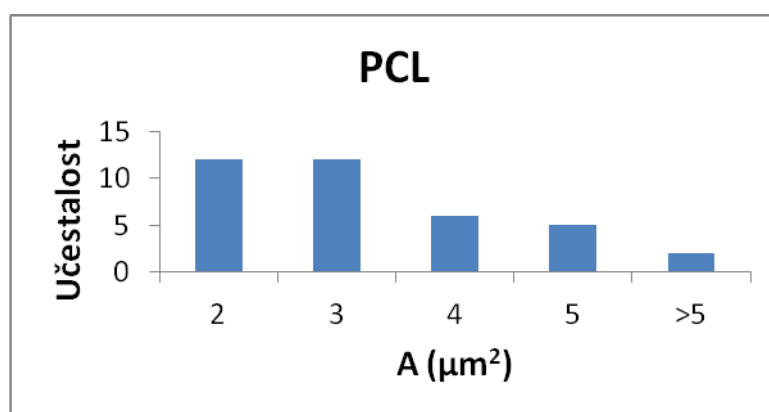
Na slici 4.1.3. dani su histogrami distribucije promjera vlakana elektroispređenih PCL/CFU sa 10 % antibiotika.



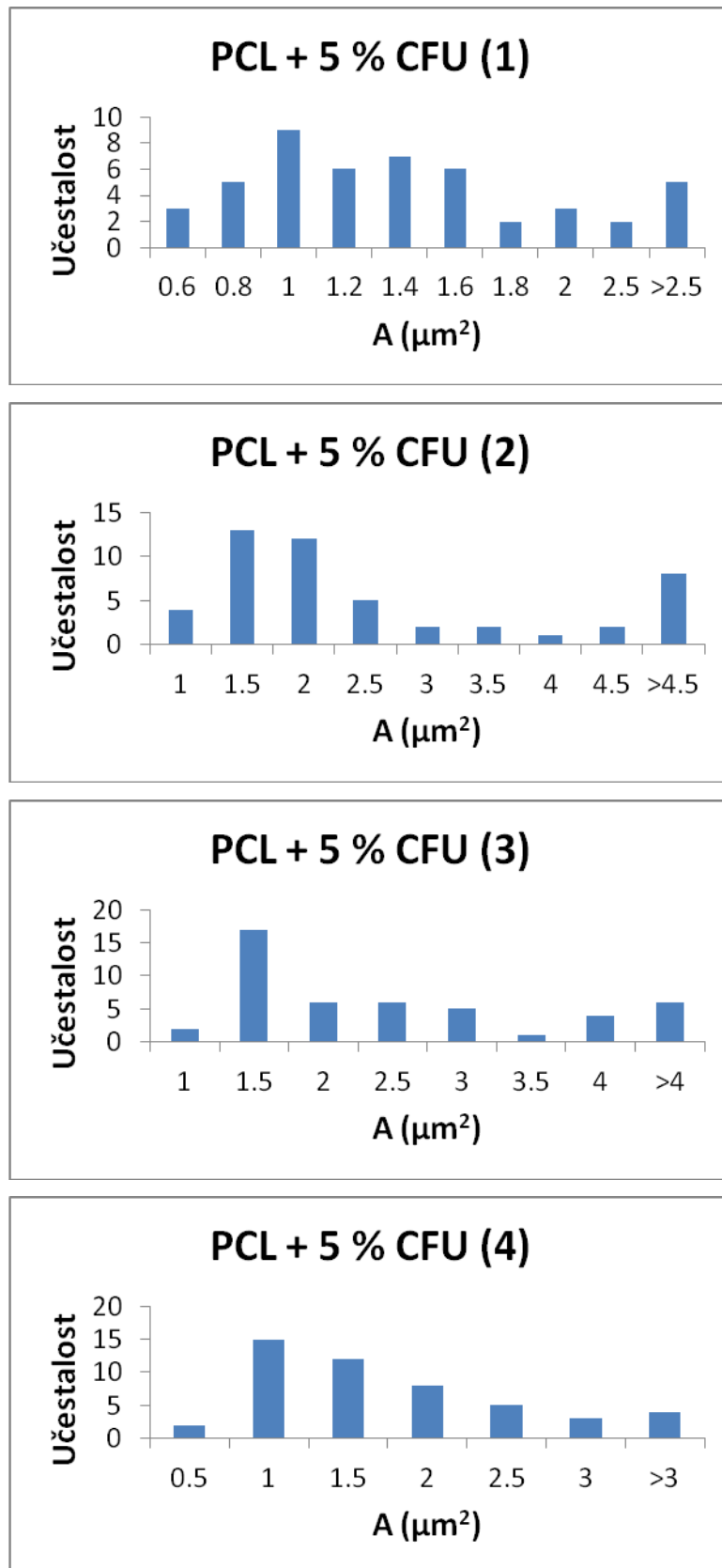
SI. 4.1.3. Distribucija promjera vlakana elektroispređenih PCL/ 10 % CFU materijala.

Iz priloženih rezultata jasno se vidi da najprije dodatak antibiotika smanjuje raspon distribucije promjera vlakana kada se uspoređuju promjeri vlakana čistog PCL i PCL/CFU materijala s 5 i 10 % antibiotika. Veće smanjeno distribucije promjera vlakana se pojavljuje kod veće koncentracije antibiotika i to kod čistog PCL-a promjeri vlakana su u rasponima od 300 nm do nešto iznad 1 μm dok u slučaju PCL/ 10 % CFU su od 100 do 400 nm. Ako se usporede promjene distribucije promjera vlakana u ovisnosti o korištenom kolektoru (kolektori od 1-4), npr. kod elektroispredjenih PCL/ 5 % CFU materijala pokazalo se da vrsta kolektora manje utječe na distribuciju promjera vlakana, ali generalno se može zaključiti da se raspon smanjuje povećanjem visine centralnog valjka. Pa su se tako promjeri vlakana smjestili u rasponima od 200 nm do iznad 800 nm kod kolektora 1 i od 200 nm do iznad 400 nm kod kolektora 4. U slučaju elektroispredjenih PCL/ 10 % CFU materijala razlika u rasponima distribucije promjera vlakana je skoro neznačajna tj. rasponi kod skoro svih materijala elektroispredjenih na kolektorima od 1-4 su bili od 200 do 300 nm, uz jako mali broj promjera vlakana iznad 300 nm. Ovim rezultatima može se zaključiti da najutjecajniji faktor na distribuciju promjera vlakana je svakako koncentracija polimerna otopine. Ovo je i za očekivati jer sami kolektori imaju zadatak da "proizvede" dualnu strukturu u kojima kompaktnije i rahlije pozicioniranje vlakana je prisutno što je od veliki značaj za adheziju, migraciju i kolonizaciju stanica u dublje slojeve elektroispredjenih nosača.

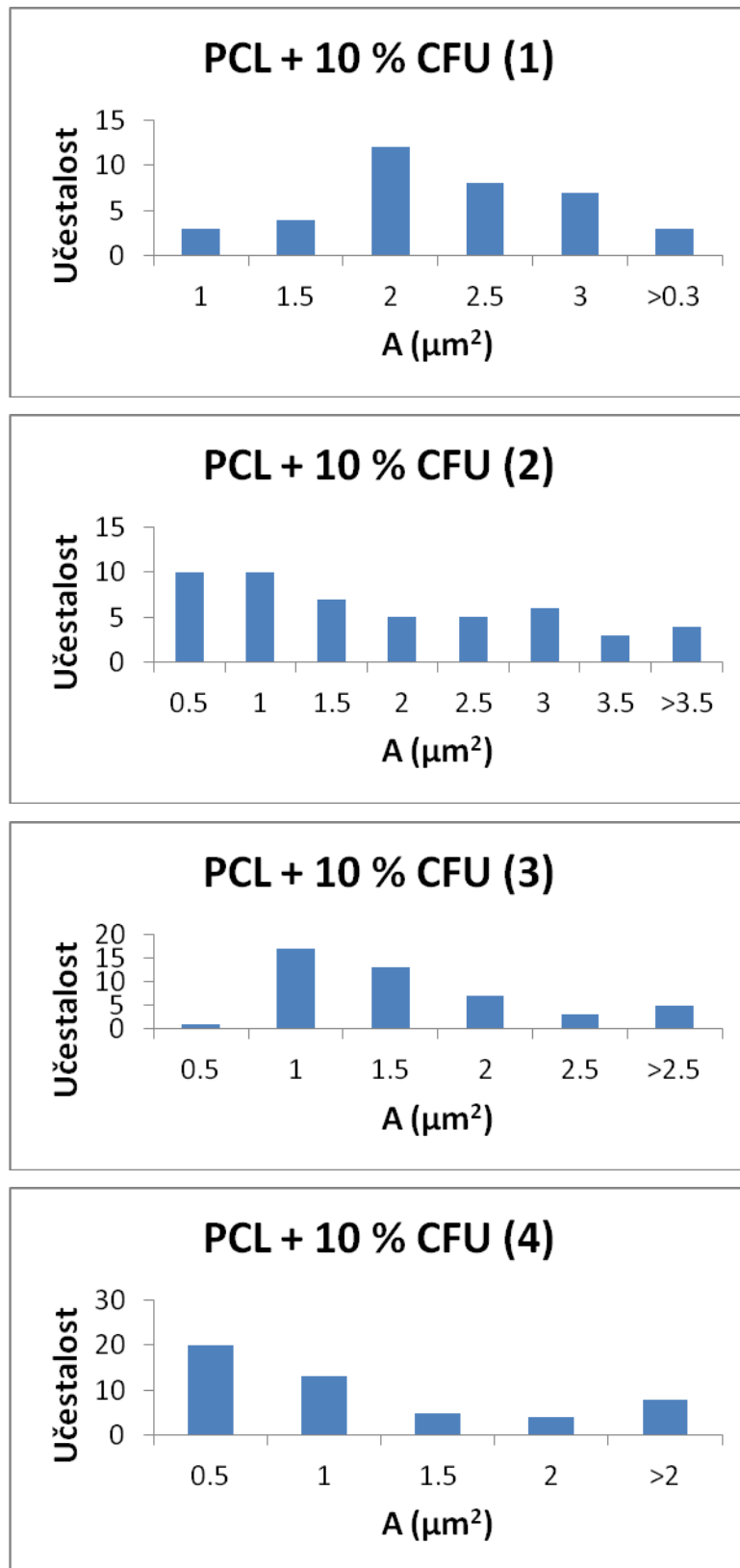
Na slici 4.1.4. dan je histogram distribucije površine pora elektroispredjenog PCL-a. Na slici 4.1.5. i 4.1.6. dani su histogrami distribucije površine pora elektroispredjenih PCL/CFU sa 5 i 10 % antibiotika.



SI. 4.1.4. Distribucija površina pora elektroispredjenog PCL materijala.



SI. 4.1.5. Distribucija površina pora elektroispređenih PCL/ 5 % CFU materijala.



SI. 4.1.6. Distribucija površina pora elektroispredenih PCL/ 10 % CFU materijala.

Uzimajući u obzir promjenu promjera vlakana za očekivati je da su se rasponi distribucije površine pora dodatkom, te povećanjem koncentracije antibiotika također promijenili ali u ovom slučaju dolazi do povećanja raspona. Kod elektroispređenog PCL-a raspon distribucije površine pora je bio od 2 do iznad $5 \mu\text{m}^2$. Kod elektroispređenih PCL/ 5 % CFU materijala raspon distribucije površine pora je pokazao najznačajniju promjenu u slučaju elektroispređenja na kolektoru 1 gdje su površine pora od 0,6 do iznad $2,5 \mu\text{m}^2$. Kod ostalih kolektora materijali su generalno pokazali smanjenja raspona od 1 do iznad $3 \mu\text{m}^2$. U slučaju elektroispređenih PCL/ 10 % CFU materijala rasponi distribucije površine pora se smanjuju kod materijala elektroispređenih na kolektoru 3 i 4 (rasponi su od 0,5 do iznad $2 \mu\text{m}^2$). Kod kolektora 1 i 2 izmjerene površine pora su najviše do iznad $3,5 \mu\text{m}^2$.

U tablici 4.1.1. dane su srednje vrijednosti i standardna devijacija promjera vlakana i površina pora elektroispređenih materijala. Promjena promjera vlakana i površina pora povezuje se s promjenom količine antibiotika, a kao drugi faktor je svakako vrsta korištenog kolektora, odnosno visina centralnog valjka unutar heksagona koja raste do najviše 5 mm.

Tab. 4.1.1. Srednje \pm SD vrijednosti promjera vlakana i površine pora.

Elektroispređeni materijal	$d_{\text{vlakna}} (\mu\text{m})$	$A_{\text{pora}} (\mu\text{m}^2)$
PCL čisti	$0,623 \pm 0,375$	$2,735 \pm 1,088$
PCL + 5 % CF ¹	$0,371 \pm 0,236$	$1,378 \pm 0,680$
PCL + 10 % CF ¹	$0,221 \pm 0,122$	$1,880 \pm 0,724$
PCL + 5 % CF ²	$0,284 \pm 0,143$	$3,033 \pm 3,237$
PCL + 10 % CF ²	$0,202 \pm 0,107$	$1,740 \pm 1,471$
PCL + 5 % CF ³	$0,395 \pm 0,213$	$2,615 \pm 2,363$
PCL + 10 % CF ³	$0,222 \pm 0,102$	$1,432 \pm 0,722$
PCL + 5 % CF ⁴	$0,256 \pm 0,145$	$1,522 \pm 0,909$
PCL + 10 % CF ⁴	$0,168 \pm 0,082$	$1,251 \pm 1,637$

Iz tablice se jasno vidi da dodatak antibiotika u PCL, te dodatno povećanje količine istog za 50 %, smanjuje srednju vrijednost promjera vlakana za više od 50 % u odnosu na čistog PCL-a (npr. od 623 nm na 221 nm kod elektroispređenog PCL/CFU

na kolektoru 1). Najmanji srednji promjer vlakana i najveća promjena u odnosu na promjer čistog PCL-a utvrđen je kod PCL + 10 % CF⁴. Istovremeno se može zaključiti i da smanjenju promjera vlakana svakako doprinosi i visina centralnog valjka. Povećanjem visine centralnog valjka (veća razlika između visine manjih valjaka i centralnog valjka) dolazi do smanjenja promjera vlakana. Ako se usporede uzorke s istom koncentracijom antibiotika, npr. od 5 % CFU, promjenom kolektora od 1-4 došlo je do smanjenja promjera vlakana od 371 nm do 256 nm. U slučaju 10 % CFU promjenom kolektora od 1-4 dolazi do smanjenja promjera vlakana od 221 nm do 168 nm. Iznimka u slučaju kolektora 3 može se pripisati i nehomogenoj raspodijeli antibiotika unutar vlakana što svakako utječe na pad ili rast promjera vlakana. Generalno dodatak antibiotika u PCL rezultira smanjenjem površine pora skoro kod svih PCL/CFU materijala (npr. od 2,735 μm do najmanje 1,251 μm kod PCL + 10 % CF⁴). Kod materijala s istom koncentracijom antibiotika promjena nastala utjecajem korištenog kolektora od 1-4 je takva da dolazi također do smanjenja površine pora i to s najvećom razlikom kod kolektora 2 gdje je smanjenje površine pora od 3,033 μm^2 do 1,740 μm^2 . Ovim se rezultatima pokazuje da geometrija kolektora dakako ima veliki utjecaj na morfologiju elektroispredenog materijala, te na taj način se struktura istog može kontrolirati prema vrsti i veličini tkivnih stanica.

4.2. Poroznost elektroispredenih PCL/CFU materijala

Poroznost elektroispredenih PCL/CFU materijala, tablica 4.2.1. utvrđena je računski na temelju mase, površine i debljine uzorka, te gustoće polimera odnosno mješavine polimera i antibiotika, gdje je za antibiotik uzeta gustoća od 1,8 g/cm³. Promjena poroznosti materijala utvrđena je u ovisnosti o geometriji korištenog 3D printanog kolektora, a dodatno i o ovisnosti količine antibiotika. Generalno je utvrđeno, kako se i očekivalo, da kolektorima se dobivaju poroznije strukture u odnosu na elektroispredeni PCL na ravnom kolektoru. Najveću ukupnu poroznost pokazao je elektroispredeni PCL/10 % CF⁴ i to od ~90 %. U odnosu na vrsti kolektora utvrđeno je da dodatkom centralnog valjka u geometriju kolektora, te povećanjem njegove visine do 5 mm također se povećava poroznost od 78,46 do 81,28 % kod 5 % koncentracije antibiotika ili od 75,58 do 87,46 % kod 10 % koncentracije antibiotika. Također je utvrđeno da povećanjem koncentracije antibiotika (iako ne toliko značajno) generalno dolazi do smanjenja poroznosti elektroispredenih materijala.

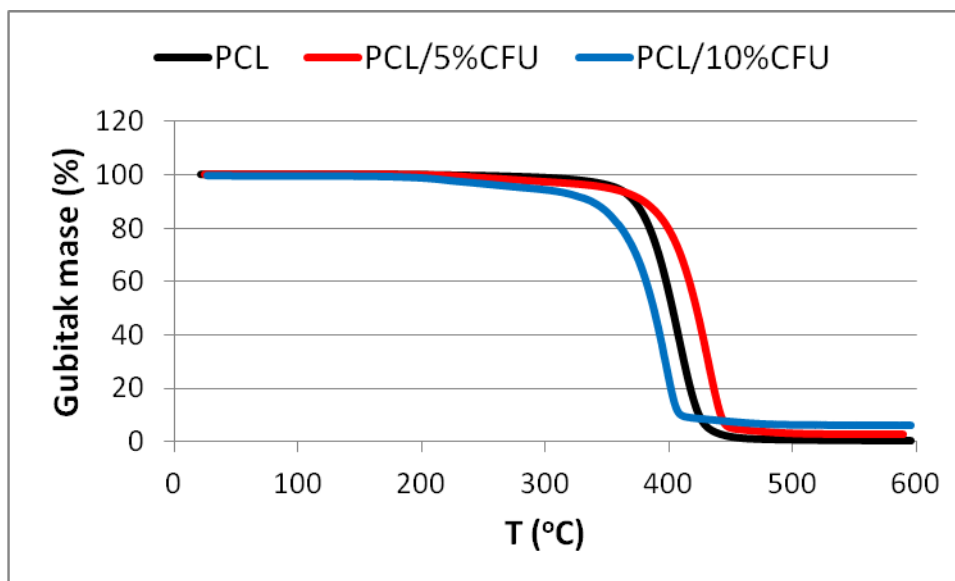
Tab. 4.2.1. Poroznost elektroispređenih PCL/CFU materijala.

Elektroispređeni materijal	ρ (g/cm ³)	m (g)	A (cm ²)	h (cm)	g/cm ²	P (%)
PCL čisti	1,145	0,0217	4,60	0,0143	4.71×10^{-3}	71,18
PCL + 5 % CFU ¹	1,15	0,0211	4,00	0,0213	5.30×10^{-3}	78,46
PCL + 10 % CFU ¹	1,17	0,0145	5,40	0,0094	2.69×10^{-3}	75,58
PCL + 5 % CFU ²	1,15	0,0092	4,62	0,0090	2.00×10^{-3}	80,76
PCL + 10 % CFU ²	1,17	0,0134	4,60	0,0117	3.00×10^{-3}	78,72
PCL + 5 % CFU ³	1,15	0,0148	4,00	0,0115	3.70×10^{-3}	72,02
PCL + 10 % CFU ³	1,17	0,0177	5,00	0,0062	3.54×10^{-3}	51,20
PCL + 5 % CFU ⁴	1,15	0,0120	4,32	0,0129	2.70×10^{-3}	81,28
PCL + 10 % CFU ⁴	1,17	0,0090	4,20	0,0146	2.10×10^{-3}	87,46

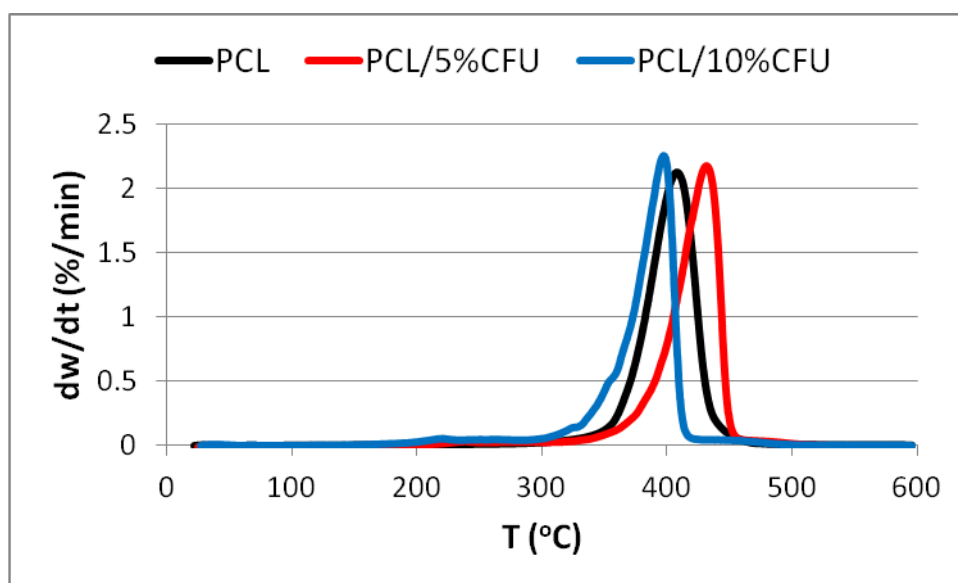
Iznimak iz navedenih zaključaka pokazao je elektroispređeni PCL/10 % CFU³ materijal, tj. pokazao je najmanju poroznost od samo 51,20 %, što se svakako prepisuje i najmanjoj debljini materijala, a što je često posljedica neravnomjernog elektroispređanja uslijed destabilizacije mlaza polimerne otopine. U konačnici materijal s najvećom poroznošću zadovoljava zahtjeve za primjenu kao nosača za uzgoj stanica, a time je potvrđeno da 3D printani kolektori pospješuju željenu fizičku strukturu nosača.

4.3. Toplinska degradacija elektroispređenih PCL/CFU materijala u ovisnosti o koncentraciji antibiotika

Na slici 4.3.1. dan je TGA graf koji prikazuje ovisnost gubitka mase elektroispređenog materijala o porastu temperature, dok na slici 4.3.2. dan DTG graf koji pokazuje temperaturu maksimalne brzine razgradnje elektroispređenog materijala. Početna temperatura razgradnje $T_{\text{poč.}}$, krajnja temperatura razgradnje $T_{\text{kraj.}}$, temperatura maksimalne brzine razgradnje $T_{\text{maks.}}$ i ostatak na 600 °C dani su u tablici 4.3.1. Utvrđeno je da dodatkom antibiotika dolazi do smanjenja toplinske stabilnosti elektroispređenog PCL-a, što odgovara i smanjenju početnih temperatura od 366,50 °C za čisti PCL na 377,58 i 344,82 °C za PCL/5 % CFU odnosno PCL/10 % CFU elektroispređenih materijala.



Sl. 4.3.1. Gubitak mase kod elektroispredenog čistog PCL-a i PCL/CFU porastom temperature.



Sl. 4.3.2. Brzina razgradnje elektroispredenog čistog PCL-a i PCL/CFU porastom temperature.

Razgradnja elektroispredenog PCL-a završava na višoj temperaturi dodatkom 5 % antibiotika, dok je u slučaju PCL s 10 % CFU krajnja temperatura niža, tablica 4.3.1.

DTG krivulja definira temperaturu maksimalne brzine razgradnje elektroispredenog materijala. Iz dobivenih krivulja utvrđeno je da se dodatkom 5 % CFU-a i 10 % CFU, maksimum (407,90 °C) vezan uz temperaturu razgradnje PCL-a pomiče prema višoj (431,79 °C) odnosno nižoj (397,41) temperaturi što ukazuje na sporiju razgradnju i

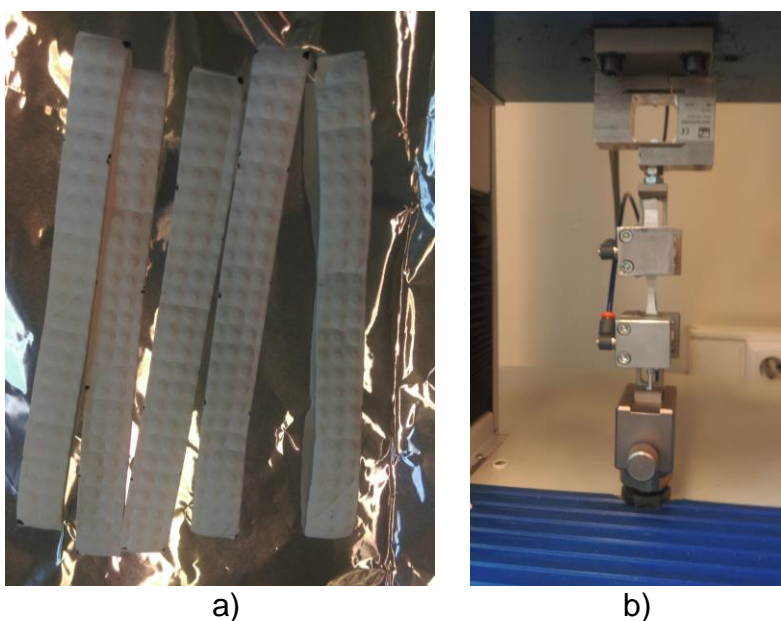
bržu razgradnju polimera, a može ukazivati na nehomogeno otapanje antibiotika ili miješanje uz PCL-a. Pikovi koji se pojavljuju na temperaturi od 238,29 i 221,16 °C kod elektroispredenog PCL/5 % CFU odnosno PCL/10 % CFU pokazuju točku maksimalne brzine razgradnje samog antibiotika. Povećanjem antibiotika također dolazi do povećanja ostatka materijala nakon razgradnje u odnosu na čisti PCL.

Tab. 4.3.1. Karakteristične temperature i ostatak nakon toplinske degradacije.

Elektroispredeni materijal	$T_{\text{poč.}}$ (°C)	$T_{\text{kraj.}}$ (°C)	$T_{\text{maks.}}$ (°C)	Ostatak na 600 °C (mg)
PCL	366,50	427,80	407,90	0,0500
PCL/5 % CFU	377,58	444,56	431,79	0,3451
PCL/10 % CFU	344,82	407,59	397,41	0,6433

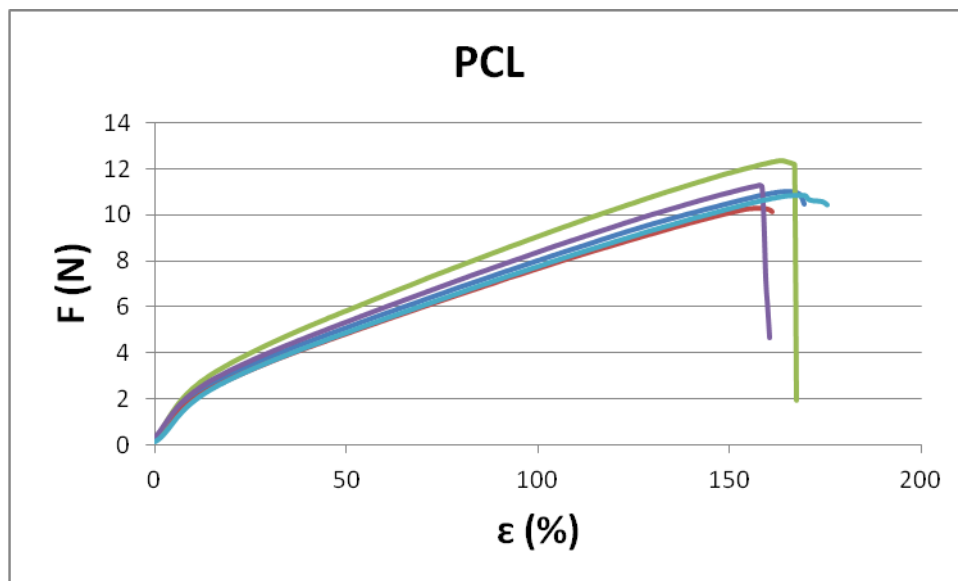
4.4. Mehanička svojstva elektroispredenih PCL/CFU materijala u ovisnosti o geometriji 3D printanih kolektora i koncentraciji antibiotika

Na slici 4.4.1. prikazan je vlačni test elektroispredenih materijala na kidalici. Vlačno ponašanje materijala prikazano je izmjerenom silom i odgovarajućem istezanju (produljenju) materijala. Izmjerena prekidna sila i površina poprečnog presjeka materijala korištene su za određivanje vlačne čvrstoće elektroispredenih materijala.

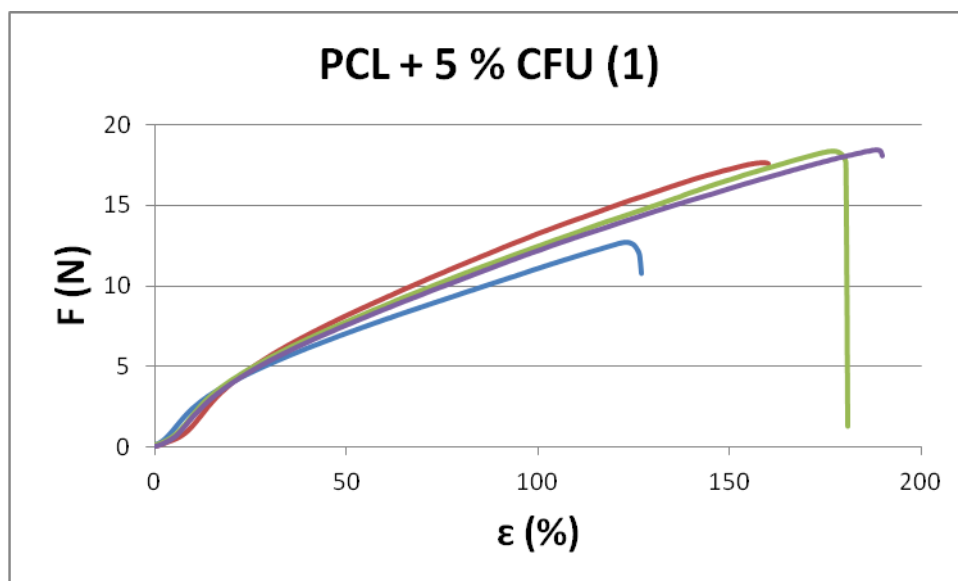


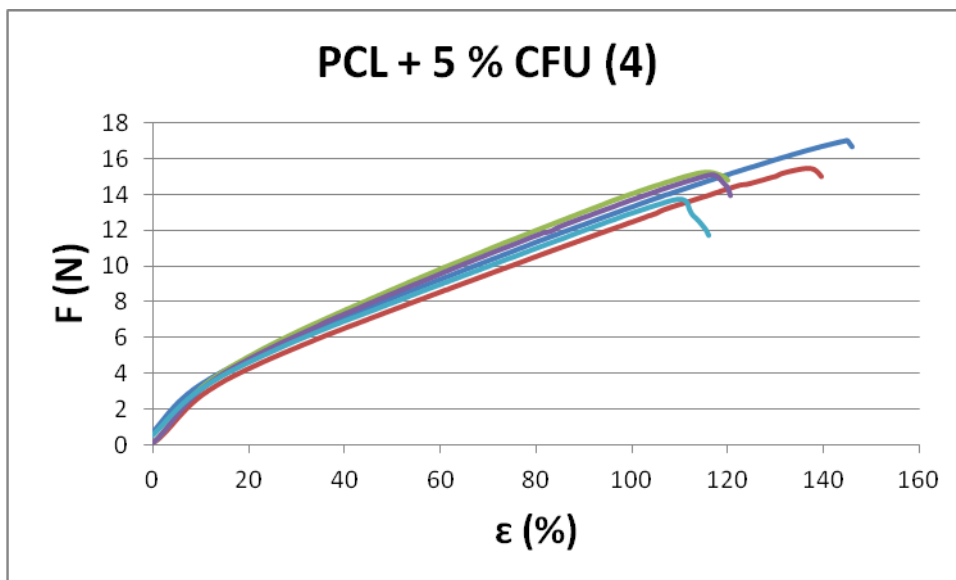
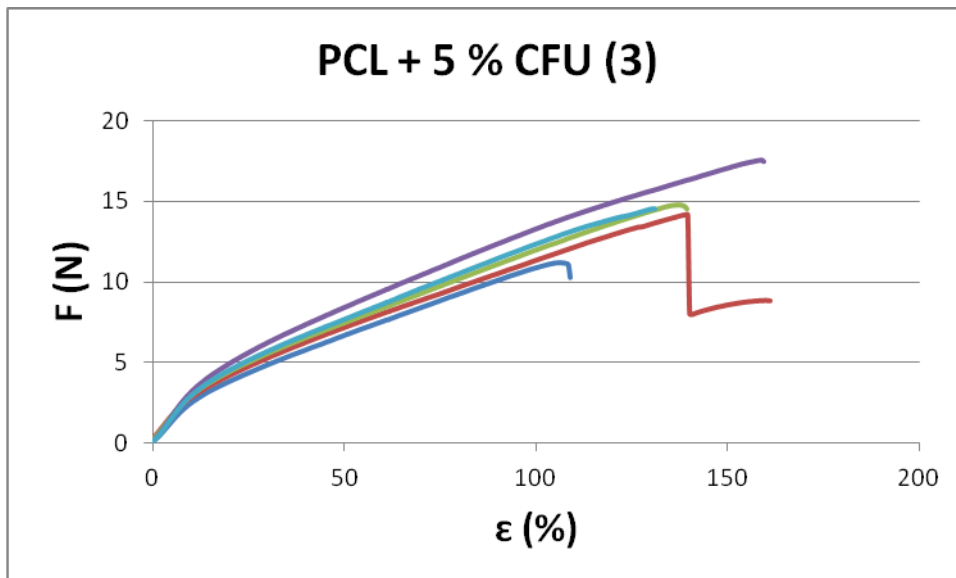
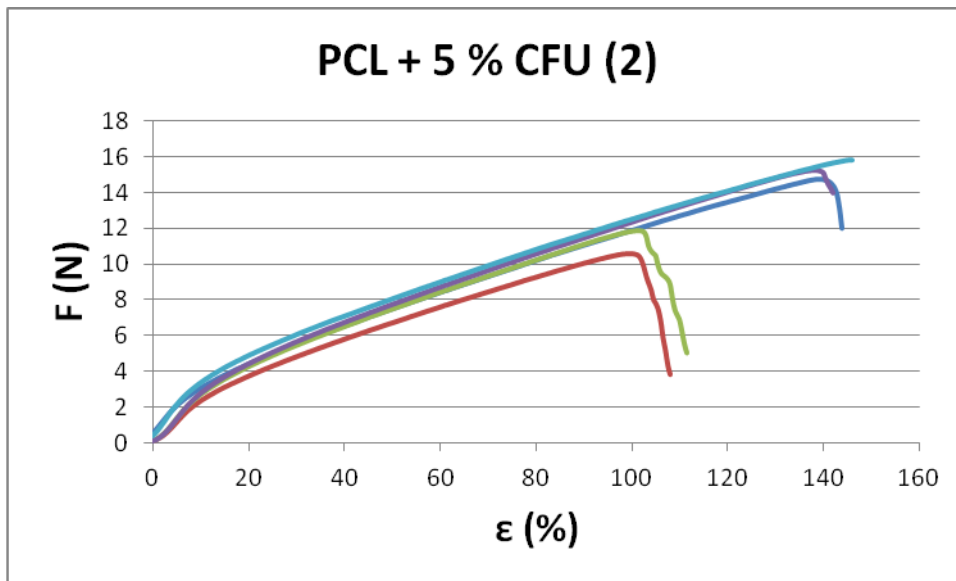
Sl. 4.4.1. Elektroispredeni materijal (a) i vlačni test elektroispredenog materijala (b).

Slike od 4.4.2. do 4.4.3. prikazuju grafove sile i istežanja pri vlačnom testu elektroispredenih PCL i PCL/CFU materijala. Tijekom ispitivanja materijala na dinamometru nije dolazilo do klizanja materijala iz stezaljki što je olakšavalo samo ispitivanje. Krivulje vlačnog testa kod svih materijala nisu pokazali male prekide tijekom ispitivanja kao rezultat klizanja vlakana unutar materijala, što se vrlo često događa kod elektroispredenih materijala. Tablica 4.4.1. daje podatke o prekidnoj sili, prekidnom istežanju i izračunatoj prekidnoj čvrstoći. Podaci su uzeti za po jedno reprezentativno mjerenje od svakog uzorka.

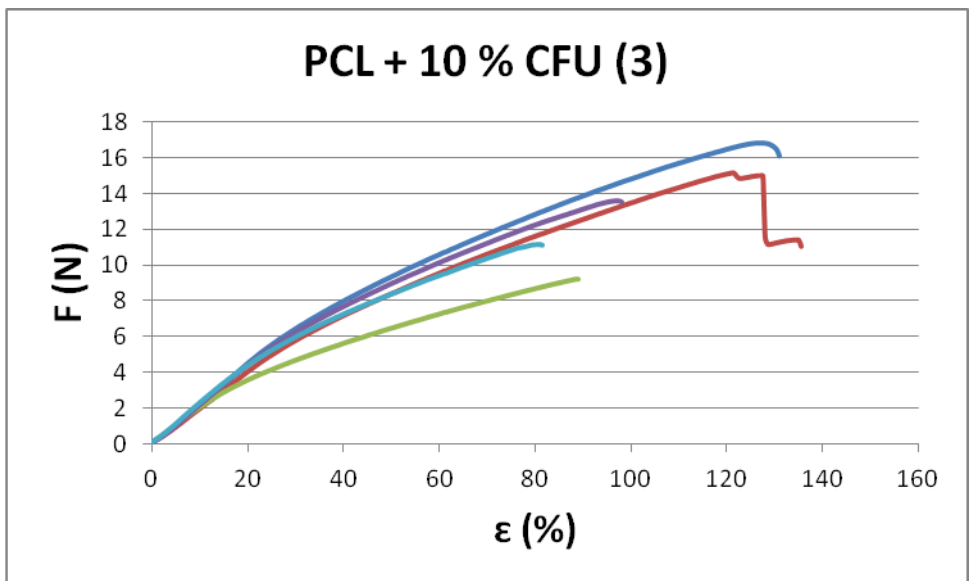
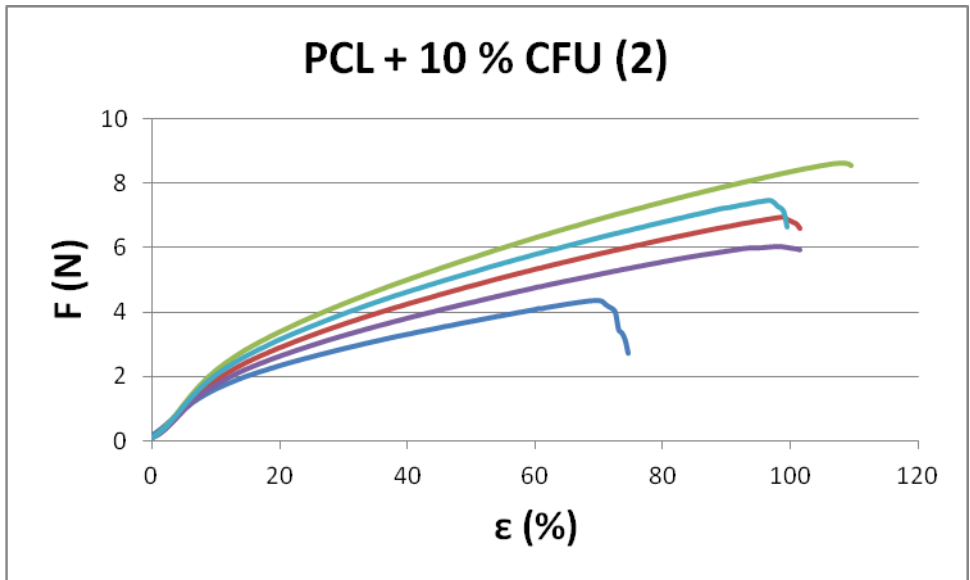
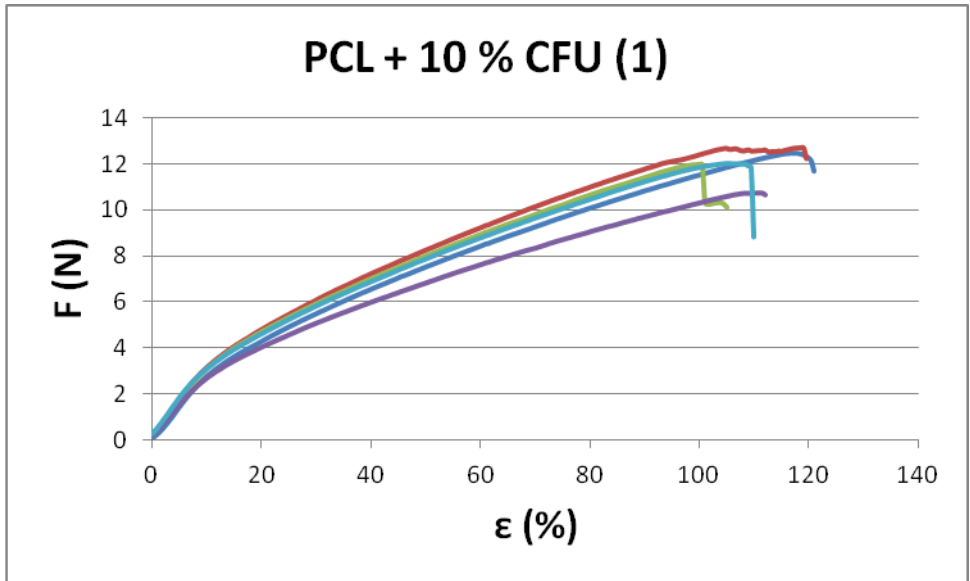


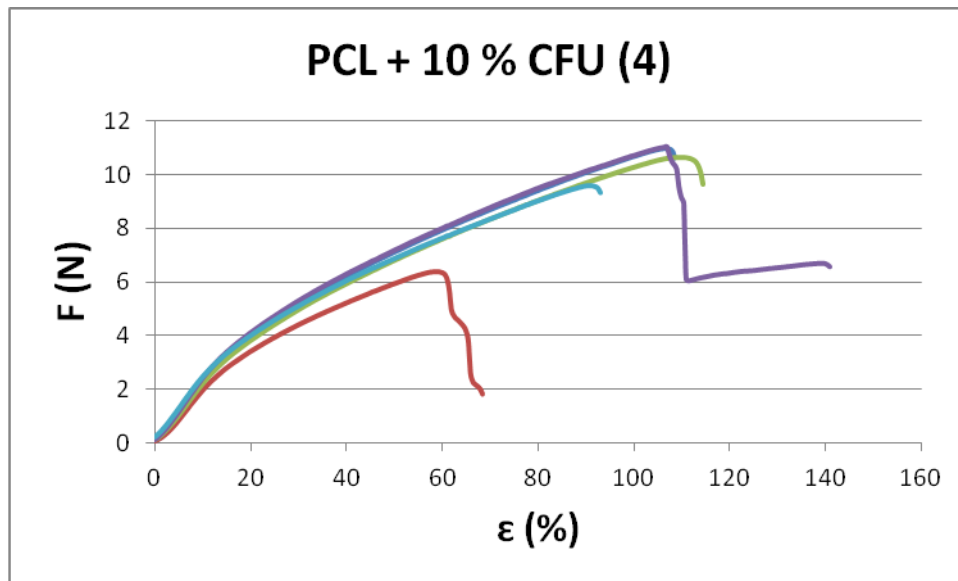
Sl. 4.4.2. Vlačno ponašanje elektroispredenog PCL materijala.





SI. 4.4.2. Vlačno ponašanje elektroispređenih PCL/5 % CFU materijala.





Sl. 4.4.3. Vlačno ponašanje elektroispredenih PCL/10 % CFU materijala.

Tab. 4.4.1. Mehanička svojstva elektroispredenih PCL i PCL/CF materijala.

Elektroispredeni materijal	F (N)	ε (%)	σ (MPa)
PCL čisti	11,16 ± 0,79	162,5 ± 4,70	7,80
PCL + 5 % CF ¹	16,79 ± 2,76	161,75 ± 28,64	7,88
PCL + 10 % CF ¹	12,01 ± 0,77	110,2 ± 8,02	12,78
PCL + 5 % CF ²	13,65 ± 2,29	124,90 ± 22,48	15,17
PCL + 10 % CF ²	6,68 ± 1,60	94,2 ± 14,60	5,71
PCL + 5 % CF ³	14,47 ± 2,27	134,60 ± 19,23	12,59
PCL + 10 % CF ³	13,19 ± 3,06	124,9 ± 15,02	21,27
PCL + 5 % CF ⁴	15,30 ± 1,16	103,2 ± 20,08	11,86
PCL + 10 % CF ⁴	9,72 ± 1,95	94,5 ± 21,52	6,66

Odgovarajuća mehanička svojstva elektroispredenih nosača od izuzetne su važnosti za odupiranje silama koje se javljaju prilikom formiranja novog tkiva, pa stoga ista moraju biti i u skladu s vrstom zasijanih stanica. Izmjerene prekidne sile elektroispredenih materijala su u rasponu od oko 7 do oko 17 N. Utvrđeno je da dodatkom antibiotika od 5 % dolazi do povećanja prekidne sile, dok u slučaju dodatka od 10 % cefuroxima ista varira, te je najveći porast bio od 11,16 (PCL) do 13,19 (PCL + 10 % CF³), odnosno najveći pad do 6,68 N (PCL + 10 % CF²).

Generalno dodatkom antibiotika i povećanjem njegove koncentracije smanjuje se prekidno istezanje materijala do maksimalno oko 70 % kod PCL + 10 % CF⁴. Varijacija u trendu porasta i pada prekidne sile i prekidnog istezanja može se pripisati mogućoj nehomogenoj raspodijeli antibiotika unutar polimerne matrice. Uslijed destabilizacije mlaza prilikom elektroispredanja vrlo često debljina materijala također varira što pridonosi varijaciji rezultata. Vrsta kolektora u slučaju PCL + 5 % antibiotika rezultirala je porastom prekidne čvrstoće porastom visine centralnog valjka kolektora, te je izračuna najveća prekidna čvrstoća od 15,17 MPa u slučaju PCL + 5 % CF² materijala. U slučaju PCL + 10 % antibiotika najveća prekidna čvrstoća od 21,27 MPa izračunata je kod PCL + 10 % CF³ materijala.

4.5. Otpuštanje antibiotika iz elektroispredanih PCL/CFU materijala

U tablici 4.5.1. dane su vrijednosti apsorbancije fiziološke otopine uzete nakon svakih 24 sata iz bočica u kojima se nalaze elektroispredani PCL/CFU materijali.

Tablica 4.5.1. Apsorbancija fiziološke otopine s otpuštenim antibiotikom.

Periodi mjerenja	PCL + 5 % CFU	PCL + 10 % CFU
1. dan	0,001 A	0,001 A
2. dan	0,003 A	0,003 A
3. dan	0,005 A	0,005 A
4. dan	0,012 A	0,036 A
5. dan	0,024 A	0,021 A
7. dan	0,000 A	0,007 A
8. dan	1,170 A	1,120 A
9. dan	1,130 A	1,100 A

Obzirom da nakon operacije oka, terapija s kapima otopine cefuroxima traje od 7-10 dana, u ovom eksperimentu mjerenje je izvršeno kontinuirano u trajanju 9 dana. Apsorbancija i njezina promjena ukazuje na prisutnost otpuštenog antibiotika u fiziološku otopinu jer otapanjem lijeka dolazi do zamućenja iste. Iz izmjerenih vrijednosti jasno se vidi da svakim danom dolazi do povećanja apsorbancije kod obje koncentracije antibiotika. Iako na početku kod elektroispredanog PCL + 10 % CFU materijala porast je bio veći, što je i za očekivati zbog veće koncentracije CFU-a,

kasnije se ispostavilo da materijal PCL + 10 % CFU pokazuje veću apsorbancu (nakon dana 5) i to od maksimalno 1,170 na dan 8. Ovakav neočekivani preokret se može pripisati opet nehomogenoj kapsulaciji antibiotika u elektroispredena vlakna što svakako pridonosi količini otpuštenog CFU-a. Iako rezultati nisu pokazali stabilan trend porasta svakako su dokaz uspješnom elektroispredanju PCL-a u ulozi tkivnog nosača za prijenos lijekova i kontroliranu terapiju tkiva oka.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu uspješno su pripremljeni elektroispredeni polikaprolakton/cefuroxim materijali ciljane topografije korištenjem 3D printanih kolektora ciljane geometrije s temeljnom ponavljajućom jedinicom u obliku heksagona. Temeljem provedene analize, a u skladu s postavljenim specifičnim ciljevima rada, doneseni su sljedeći zaključci, a u vezi:

1. Morfoloških karakteristika

Koncentracija antibiotika utječe na morfološka svojstva materijala, odnosno povećanjem koncentracije dolazi do smanjenja promjera vlakana. Površina pora se smanjuje dodatkom 10 % cefuroxima. S istom koncentracijom antibiotika promjena nastala utjecajem korištenog kolektora od 1-4 je takva da dolazi do smanjenja površine pora i to s najvećom razlikom kod kolektora 2. Ovi rezultati pokazuju da geometrija kolektora dakako ima veliki utjecaj na morfologiju elektroispredenog materijala, te na taj način se struktura istog može kontrolirati prema vrsti i veličini tkivnih stanica.

2. Poroznosti

U odnosu na vrstu kolektora utvrđeno je da dodatkom centralnog valjka u geometriju kolektora, te povećanjem njegove visine do 5 mm također se povećava poroznost. Utvrđeno je da povećanjem koncentracije antibiotika (iako ne toliko značajno) generalno dolazi do smanjenja poroznosti elektroispredenih materijala.

3. Toplinske degradacije

Na dobivenim krivuljama utvrđeno je da se dodatkom 5 % CFU-a i 10 % CFU, maksimum (407,90 °C) vezan uz temperaturu razgradnje PCL-a pomiče prema višoj (431,79 °C) odnosno nižoj (397,41) temperaturi što ukazuje na sporiju razgradnju i bržu razgradnju polimera. Povećanjem antibiotika također dolazi do povećanja ostatka materijala nakon razgradnje u odnosu na čisti PCL.

4. Mehaničkih svojstava

Dodatkom antibiotika i povećanjem njegove koncentracije smanjuje se prekidno istezanje materijala do maksimalno oko 70 % kod PCL + 10 % CF⁴. Varijacija u

trendu porasta i pada prekidne sile i prekidnog istezanja može se pripisati mogućoj nehomogenoj raspodijeli antibiotika unutar polimerne matrice. Koncentracija od 5 % antibiotika rezultirala je porastom prekidne čvrstoće porastom visine centralnog valjka kolektora, najveća prekidna čvrstoća od 15,17 MPa izračunata je u slučaju PCL + 5 % CF² materijala.

5. Otpuštanja antibiotika

Iako rezultati nisu pokazali stabilan trend porasta, svakako su dokaz uspješnom elektroispredanju PCL-a u ulozi tkivnog nosača za prijenos lijekova i kontroliranu terapiju tkiva oka. Neočekivana, oslobođena veća količina antibiotika (zadnja 2 dana eksperimenta) kod materijala s 5 % CFU-a može se pripisati nehomogenoj kapsulaciji antibiotika u elektroispredena vlakna što svakako pridonosi količini otpuštenog CFU-a.

6. LITERATURA

- [1] Zdraveva, E., Magovec, E., Mijović, B.: Elektroispredanje, značajna tehnika 21. stoljeća, Tekstil: časopis za tekstilnu tehnologiju i konfekciju, 65 (2016) 11-12, 397-409.
- [2] Rim, N. G., Shin C. S., Shin, H.: Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering, Biomedical Materials 8 (2013) 1, 014102.
- [3] Bhardwaj N., Kundu S.: Electrospinning a fascinating fiber fabrication technique, Biotechnology Advances, 28 (2010) 3, 325-47.
- [4] Meyer, U., Meyer, T. H., Handschel, J., Wiesmann, H. P.: Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Springer, New York, 2009
- [5] Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., Langer, R.: Nanotechnological strategies for engineering complex tissues, Nature Nanotechnology, 6 (2011) 13-22.
- [6] Bosworth, L.: Electrospinning for Tissue Regeneration 1st Edition, Woodhead Publishing, ISBN: 9780857092915, 2011, str. 424. (Agrawal, Ray, 2001; Puppi et al., 2010; Lutolf et al., 2003;).
- [7] Zhao, S., Zhao, X., Dong, S., Yu, J., Pan, G., Zhang, Y., Zhao, J., Cui, W.: A hierarchical, stretchable and stiff fibrous biotemplate engineered using stagger-electrospinning for augmentation of rotator cuff tendon-healing, Journal of Materials Chemistry B, 3 (2015) 990-1000.
- [8] Balaji, A., Vellayappan, M. V., John, A. A., Subramanian, A. P., Jaganathan, S. K., Supriyanto, E., Razak, S. I. A.: An insight on electrospun-nanofibers-inspired modern drug delivery system in the treatment of deadly cancers, RSC Advances, 5 (2015) 57984-58004.
- [9] Mitchell, G. R.: Electrospinning principles, Practice and Possibilities, Issue 14 of Polymer Chemistry Series, Royal Society of Chemistry, ISBN 978-1-84973-556-8, 2015, str. 288.
- [10] Yuan, Z., Zhao, J., Chen, Y., Yang, Z., Cui, W., Zheng, Q.: Regulating Inflammation Using Acid-Responsive Electrospun Fibrous Scaffolds for Skin Scarless Healing, Mediators of Inflammation, Volume 2014 (2014), Article ID 858045, 11 pages.
- [11] Dyakonov, T., i sur., Design and Characterization of a Silk-Fibroin-Based Drug Delivery Platform Using Naproxen as a Model Drug, Journal of Drug Delivery, 2012

- [12] Campbell, N. A., Reece, J. B.: Biology. 8th Ed., Person International Edition, San Francisco, (2008),
- [13] Koperska, M. A., Pawcenis, D., Bagniak, J., Zaitz, M. M., Missori, M., Łojewski, T., Łojewska, J.: Degradation markers of fibroin in silk through infrared spectroscopy, 105 (2014) 185-196.
- [14] Čatić, I., BARIĆ, G., Cvjetičanin, N., Galić, K., Godec, D., Grancarić, M. A., Katavić, K., Kovačić, T., Raos, P., Rogić, A., Rujnić-Sokele, M., Vranješ, N., Vrsaljko, D., Andričić, B., Polimeri - od prapočetka do plastike i elastomera, Polimer, 31 (2010) 2, 59-70.
- [15] Woodruff, M. A., Hutmacher, D. W.: The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century, Progress in Polymer Science, 35 (2010) 10, 1217-1256.
- [16] Dostupno na: <http://www.livescience.com/48747-eye-infections-contact-lenses.html>, Posjećeno: 15.01.2018.
- [17] Dostupno na: <http://www.krenizdravo.rtl.hr/korisno/upute/novocef-tablete-500-mg-uputa-o-lijeku>, Posjećeno: 15.01.2018.
- [18] An, J., Ee Mei Teoh, J., Ratima, S., Kai Kua, C.: Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues, Engineering, 1 (2015) 2, 261-268.
- [19] Mijović, B., Tominac Trcin, M., Agić, A., Zdraveva, E., Bujić, M., Špoljarić, I., Košec, V.: Study on cell adhesion detection onto biodegradable electrospun PCL scaffolds, Journal of Fiber Bioengineering & Informatics, 5 (2012) 1, 33-40.
- [20] Chan, B. P., Leong, K. W.: Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations, European Spine Journal, 17 (2008) 4, 467-479.
- [21] Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., Discher, D. E.: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, Cell, 126 (2006) 4, 677-689.
- [22] Cejkova, J., Cejka, C., Trosan, P., Zajicova, A., Sykova, E., Holan, V.: Treatment of alkali-injured cornea by cyclosporine A-loaded electrospun nanofibers - An alternative mode of therapy, Experimental Eye Research, 147 (2016) 128-137.
- [23] In Kim, J., In Hwang, T., Aguilar, L. E., Hee Park, C., Sang Kim, C.: A Controlled Design of Aligned and Random Nanofibers for 3D Bi-functionalized Nerve Conduits Fabricated via a Novel Electrospinning Set-up, Scientific Reports, 6 (2016) 23761.

- [24] Dostupno na: <https://3dprintingindustry.com/3d-printing-basics-free-beginners-guide#02-history>, Posjećeno: 15.01.2018.
- [25] Mijović, B.: Primjena 3D printera u proizvodnji modne obuće, *Koža&obuća*, 10-12 (2015) 22-24.
- [26] Pilipović, A.: Aditivna proizvodnja, *Polimeri*, 33 (2012) 3-4, 134-135.
- [27] Matthews, J.: 3D Printing Breaks Out of Its Mold, *Physics Today*, 64 (2011) 10, 25-28.
- [28] Šercer, M., Jerbić, B., Filetin, T.: II. Predavanje "Napredne tehnologije materijala" Smjer: Inženjerstvo materijala, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 2008.
- [29] Gebhardt, A.: Understanding Additive Manufacturing, Rapid Prototyping - Rapid Tooling - Rapid Manufacturing, Carl Hanser Verlag, Munich, ISBN: 978-3-446-42552-1, 2012, str. 164.
- [30] Vrbanc, D.: Analiza dostupnih postupaka brze izrade prototipova, diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Strojarski fakultet u Slavenskom Brodu, 2011.
- [31] Dostupno na: <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/3d-printing.asp>, Posjećeno: 15.01.2018.
- [32] Ventola, C. L.: Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses Pharmacy and Therapeutics, 39 (2014) 10, 704-711.
- [33] Dostupno na: <https://inhabitat.com/these-beautiful-customized-3d-printed-prosthetic-legs-are-made-to-be-seen/>, Posjećeno: 15.01.2018.
- [34] Dostupno na: <https://inhabitat.com/these-beautiful-customized-3d-printed-prosthetic-legs-are-made-to-be-seen/>, Posjećeno: 15.01.2018.
- [35] Dostupno na: <http://www.bio3dp.xyz/2017/02/04/2042/3d-printed-blood-vessel-network-from-rice-university-jordan-miller-successfully-implanted-in-rat/>, Posjećeno: 15.01.2018.
- [35] Yu, Y., Hua, S., Yang, M., Fu, Z., Teng, S., Niu, K., Zhao, Q., Yi, C.: Fabrication and characterization of electrospinning/3D printing bone tissue engineering scaffold, *RSC Advances* 6 (2016) 112, 110557-110565.
- [36] Xu, T. Binder, K. W., Albanna, M. Z., Dice, D., Zhao, W., Yoo, J. J., Atala, A.: Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications, *Biofabrication*, 5 (2013) 1, 015001.
- [37] Dostupno na: <http://3dprinter.com.hr/k8200-3d-printer/>, Posjećeno: 15.01.2018.

- [38] Dostupno na: <https://www.fei.com/products/sem/quanta-sem/>, Posjećeno: 15.01.2018.
- [39] Kovačić, T., Andričić, B.: Struktura i svojstva polimera, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2007.
- [40] Dostupno na: https://www.wotol.com/1-perkin-elmer-lambda-ez201-uv-vis-spectrophotomet/second-hand-machinery/prod_id/1633374, Posjećeno: 15.01.2018.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru red. prof. dr. sc. Budimiru Mijoviću, na ukazanom povjerenju i podržavanju prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se neposrednoj voditeljici dr. sc. Emiliji Zdravevi, na pruženom strpljenju, ljubaznosti, nesebičnoj pomoći i svom uloženom trudu tijekom ovog projekta.

Zahvala izv. prof. dr. sc. Antoneti Tomljenović sa Zavoda za materijale vlakna i ispitivanje tekstila, Sveučilišta u Zagrebu Tekstilno-tehnološkog fakulteta, na svim savjetima i uputama.

Zahvala red. prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsic sa Zavoda za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju, Sveučilišta u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, na ukazanoj pomoći i ljubaznosti.

Zahvala Tei Zubin Ferri, dott. ssa mag. sa Centra za istraživanje materijala Istarske županije METRIS u Puli, za elektronsko mikroskopsko snimanje.

Zahvala Massimu Ujčić, mag. ing. s Instituta za temeljne tehničke procese, Češke Akademije znanosti, Prag, Češka, na 3D printanju kolektora.

Hvala obitelji i prijateljima na nepresušnoj razmjeni znanja, životnih lekcija i podršci.

ŽIVOTOPIS

Tonko Čipčić

Rođen je u Zagrebu, 05.04.1992. godine. Nakon završene Ekonomske škole u Zagrebu 2011. godine, upisuje preddiplomski studij na Tekstilno-tehnološkom fakultetu, smjer: Projektiranje i menadžment tekstila, kao redovan student uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske. U okviru aktivnosti vezanih uz popularizaciju znanosti sudjeluje na: 9. znanstveno-stručnom savjetovanju Tekstilna znanost i gospodarstvo s znanstvenim radom na temu: „Računalna konstrukcija uzornice pomoću matrica“, kao jedan od troje autora. 2015. godine sudjeluje na sajmu ITMA u Milanu uz aktivno sudjelovanje u popratnim programima izložbe. ITMA je najveća svjetska međunarodna izložba tekstilnih strojeva i opreme. U dogovoru s profesorom i diplomiranim studentom Tekstilno-tehnološkog fakulteta, 2016. godine odrađuje uspješno jednomjesečnu praksu u tvornici čarapa Jadran d.d. gdje usvaja nova znanja i vještine. Dobitnik je Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu za 2017. godinu pod vodstvom prof. Budimira Mijovića i dr. sc. Emilije Zdraveve. Dobitnik je Dekanove nagrade za ak. god. 2017./2018.