

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE DOLENC

**RAZVOJ IN VITRO METODE ZA SPROŠČANJE
ZDRAVILNIH UČINKOVIN IZ NANOVLAKEN**

**DEVELOPMENT OF IN VITRO METHOD FOR DRUG
RELEASE FROM NANOFIBERS**

Ljubljana, 2016

Diplomsko naložbo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in delovnim mentorstvom Tanje Potrč mag. farm. Posnetke z vrstičnim elektronskim mikroskopom je pripravila doc. dr. Petra Kocbek na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl.

Jure Dolenc

Diplomska komisija

Predsednik: prof. dr. Stanislav Gobec

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl

Članica: doc. dr. Nataša Karas Kuželički

KAZALO

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
1 UVOD	1
1.1 DEFINICIJA OSNOVNIH POJMOV.....	1
1.2 ZGODOVINA.....	1
1.3 PROCES ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA	2
1.4 PROCESNE SPREMENJLJIVKE	5
1.4.1 <i>Lastnosti raztopine</i>	6
1.4.2 <i>Nastavitve aparature</i>	7
1.4.3 <i>Pogoji okolja</i>	9
1.5 MORFOLOGIJA NANOVLAKEN	10
1.6 VGRAJEVANJE UČINKOVIN V ELEKTROSTATSKO SUKANA NANOVLAKNA	11
1.6.1 <i>Enostavno mešanje</i>	12
1.6.2 <i>Emulzije in nanosuspenzije</i>	12
1.6.3 <i>Koaksialno sukanje</i>	13
1.6.4 <i>Kovalentna vezava</i>	13
1.7 UČINEK IZBRUHA.....	14
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 <i>Polivinil alkohol</i>	18
3.1.2 <i>Natrijev ibuprofenat</i>	21
3.2 POSTOPKI IN METODE	22
3.2.1 <i>Izbor surovin</i>	22
3.2.2 <i>Preliminarna postavitev procesnih pogojev</i>	22
3.2.3 <i>Priprava raztopin za sukanje</i>	22
3.2.4 <i>Elektrostatsko sukanje</i>	24
3.2.5 <i>Optimizacija procesnih parametrov</i>	24
3.2.6 <i>Vrednotenje z elektronskim mikroskopom</i>	24
3.2.7 <i>Poskus stabilizacije</i>	25

3.2.8	<i>Priprava fosfatnega pufra</i>	25
3.2.9	<i>Postavitev metode za in vitro sproščanje</i>	25
4	REZULTATI.....	32
4.1	OPTIMIZACIJA PROCESNIH SPREMENLJIVK	32
4.2	ANALIZA POSNETKOV ELEKTRONSKEGA MIKROSKOPA	33
4.3	TOPLOTNA STABILIZACIJA NANOVLAKEN	35
4.4	INTERAKCIJE ACETONITRILA Z NATRIJEVIM IBUPROFENATOM	36
4.5	REZULTATI SPROŠČANJA.....	36
4.6	POPOLNO SPROŠČANJE UČINKOVINE IN VARIABILNOST MASE	40
5	RAZPRAVA.....	41
6	SKLEP	45
7	LITERATURA	47

Seznam okrajšav:

ES – elektrostatsko sukanje

NV – nanovlakna

PVA – polivinil alkohol

NaIBU – natrijev ibuprofenat

AcN – acetonitril

PBS – fosfatni pufer

SEM – vrstični elektronski mikroskop

POVZETEK

Nanovlakna (NV) so vrsta nanomateriala, ki jih v zadnjih letih intenzivno razvijajo za uporabo na različnih področjih, med drugim tudi kot dostavni sistem zdravilnih učinkovin in v tkivnem inženirstvu. Metoda izbora za izdelavo NV je elektrostatsko sukanje, pri katerem se polimerna nit vleče v električnem polju. Gre za dostopno in visoko prilagodljivo metodo, ki omogoča izdelavo vlaken nanometrskih premerov iz številnih vrst polimerov v enem koraku in katerih lastnosti lahko prilagajamo s spremenjanjem procesnih spremenljivk.

Naš cilj je bil razviti metodo za *in vitro* sproščanje iz NV. V ta namen smo izbrali polivinil alkohol (PVA) kot nosilni polimer in natrijev ibuprofenat (NaIBU) kot modelno učinkovino. Slednjo smo vgradili v PVA vlakna pri različnih deležih glede na maso suhih vlaken: 1, 5, 10 in 20%. V literaturi smo poiskali okvirne procesne parametre, ki smo jih optimirali za vodne raztopine z 8% PVA in izbranimi deleži NaIBU. Z uporabo vrstičnega elektronskega mikroskopa smo potrdili nastanek NV pri ibranih procesnih nastavitevah, s katerimi smo nato izdelali serije vzorcev NV za sproščanje.

Količino sproščenega NaIBU smo kvantificirali z UV-VIS spektrofotometrom. Pri načrtovanju metode smo žeeli doseči visoko stopnjo ponovljivosti, kar smo poskusili doseči z odstranitvijo PVA pred kvantifikacijo. Tega smo oborili z acetonitrilom in odstranili z centrifugiranjem. To je močno znižal občutljivost analizne metode. Zato smo zmanjšali volumen medija za sproščanje in povečali količino NV v testiranih vzorcih, ki smo jih navili na inertne steklene nosilce. S popolnim sproščanjem iz preostanka neraztopljenih NV smo določili učinkovitost vgradnje.

Klub razlikam v morfologiji NV, je bila oblika krivulj enaka za NV z različnimi vsebnostmi NaIBU. Razlike so se pojavile pri učinkovitosti vgrajevanja in deležu zaostale učinkovine. Odstopanja rezultatov so bile posledica razlik v produktivnosti, naključnih napak ter neenakomernost premerov vlaken zaradi vozlov in vpliva nadzorovane zračne vlažnosti. Za razvito metodo za *in vitro* sproščanje smo pokazali sposobnost pridobivanja ponovljivih rezultatov ter razlikovanja med formulacijskimi spremenljivkami.

Ključne besede: nanovlakna, elektrostatsko sukanje, PVA, natrijev ibuprofenat, acetonitril, *in vitro* sproščanje, SEM

ABSTRACT

Nanofibers (NF) are a type of nanomaterial which has been under intense development in recent years for use in diverse fields, among them in drug delivery and tissue engineering. The method of choice for manufacturing NF is electrospinning where a polymer fibre is drawn in an electric field. The technique is affordable and highly versatile while enabling the creation of fibres on a nano scale from various types of polymers in a single step, the properties of which can be tailored by adjusting processing parameters.

Our goal was to develop a method for *in vitro* release from nanofibers. For this purpose we selected polyvinyl alcohol as the carrier polymer and sodium ibuprofenate (NaIBU) as the model drug. The latter was incorporated into PVA fibres at different percentages as related to the mass of dry fibres: 1, 5, 10 and 20%. Initial processing parameters were selected based on literature data which we then optimized for water solutions of 8% PVA and selected NaIBU concentrations. Using scanning electron microscopy we confirmed the creation of nanofibers at selected processing parameters which we then used to create several series of NF release samples.

UV-VIS spectrophotometry was used to quantify NaIBU. Our aim in designing this method was to achieve a high degree of repeatability which we tried to achieve by removing PVA prior to quantification. The polymer was precipitated using acetonitrile and removed by centrifugation. This led to a substantial decrease in the analytical sensitivity. Because of this, the volume of release medium was reduced while the amount of NF used in release samples was increased. These were wrapped onto inert glass carriers. Complete release from the remainder of undisolved NF enabled us to determine efficiency of drug incorporation.

Despite differences in morphology, the shape of release curves was the same for NF with different quantities of NaIBU. Differences emerged at efficiency of drug incorporation and percentage of retained drug. Variation of results was due to differences in productivity, random error as well as uneven fibre diameter due to beads and the impact of uncontrolled relative humidity. We were thus able to show the ability of our method to produce reproducible release data but also to distinguishing between formulation variables.

Keywords: nanofibers, electrospinning, PVA, sodium ibuprofenate, acetonitrile, *in vitro* release, SEM

1 UVOD

1.1 DEFINICIJA OSNOVNIH POJMOV

Elektrohidrodinamsko oz. elektrostatsko sukanje (ES) (ang. electrospinning) je metoda za izdelavo vlaken nanometrskih premerov (50 nm do 1000 nm) in poljubne dožine, ki temelji na vlečenju prevodnega materiala v elektrostatskem polju (1,2).

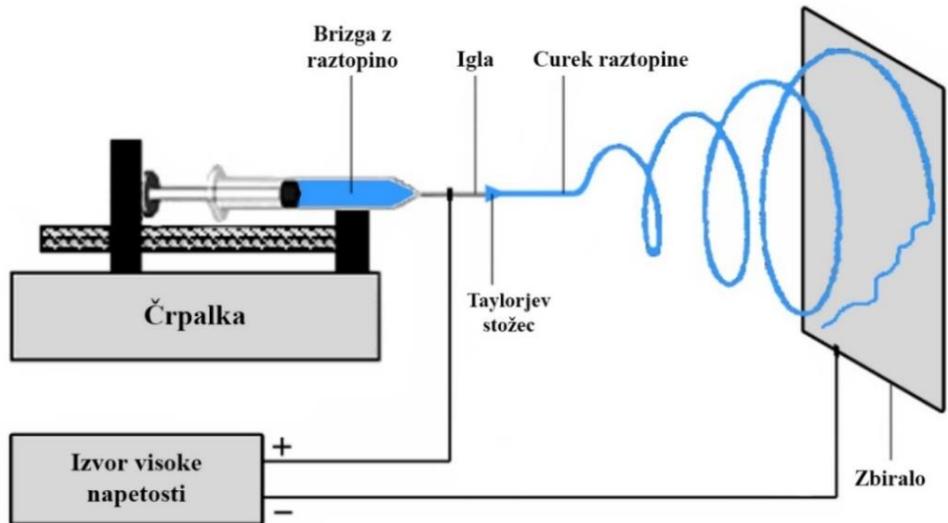
1.2 ZGODOVINA

Elektrostatsko sukana nanovlakna (NV) so v splošni uporabi zadnjih trideset let, predvsem za izdelavo visokozmogljivih filtrov (3), medtem ko so jih v nekdanji Sovjetski Zvezi pričeli izdelovati že leta 1938 in so v tem geografskem območju še danes poznana kot Petryanovi filtri (4). Kot napreden nanomaterial so elektrostatsko sukana NV pričeli obravnavati v sredini devetdesetih let prejšnjega stoletja, ko sta Reneker in Yarin s skupino objavila serijo raziskovalnih člankov, v katerih sta kot prva opisala možnost izdelave nanovlaken z ES iz več različnih vrst polimerov ter hkrati predlagala prve teoretične razlage mehanizma procesa. S tem sta postavila temelje za področje nanoznanosti, ki je v zadnjih dveh desetletjih poželo izjemno zanimanje raziskovalcev (1,5,6). Danes se z ES ukvarja preko 200 različnih univerz in raziskovalnih inštitutov (7). Gre namreč za relativno enostavno, cenovno dostopno ter izjemno prilagodljivo metodo, ki omogoča izdelavo neprekinjenih nanovlaken v enem koraku (8). Teoretično je v isti napravi mogoče sukatи vlakna submikronskih dimnezij iz več kot sto različnih tekočih polimernih disperzij, kolikor jih je raziskovalcem do sedaj uspelo izdelati (6,7). Znotraj določenega območja lahko morfologijo NV enostavno spreminjamo zgolj s prilagajanjem procesnih parametrov (1,2,6). ES omogoča vključitev majhnih, kot tudi kompleksnih bioloških molekul v ogrodja iz NV in celo inkapsuliranje intaktnih celic, kjer blagi procesni pogoji ne povzročajo denaturiranja oz. odmrtva (9). Ideje o uporabnosti ES na novih področjih porajajo nove možnosti za izdelavo kompozitnih polimernih ogrođij ter kemijske ali fizikalne modifikacije (8,10).

NV izdelana z ES premorejo izjemno razmerje med površino in volumnom, zaradi česar predstavljajo velik tehnološki potencial za uporabo na raznolikih področjih: filtri, senzorji, katalizatorji, zaščitna oblačila, fotovoltaika, elektronika, hramba in proizvodnja energije itd. Danes se v biomedicini intenzivni raziskovalni naporji posvečajo izdelavi ogrodij za tkivno inženirstvo, naprednih oblog za rane ter farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem zdravilnih učinkovin (2,11,12,13,14,15).

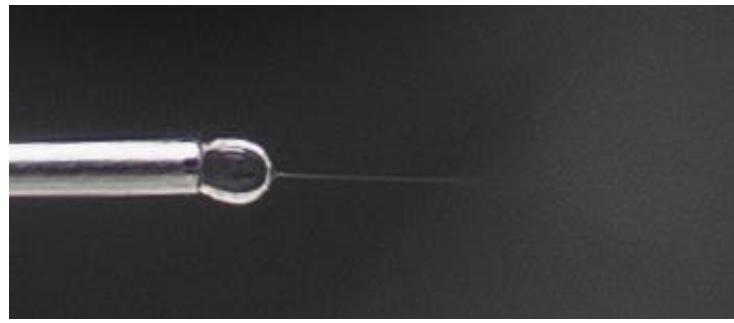
1.3 PROCES ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA

V najenostavnejši izvedbi ES obsega plastično brizgo, ki je napolnjena s prevodno raztopino polimera in na katero je pritrjena igla določenega premera. Nasproti igli je postavljeno ozemljeno ploščato zbiralo (slika 1). Črpalka skozi iglo enakomerno potiska raztopino in na konici ustvari kapljico. Z generatorjem visoke napetosti se med iglo in zbiralom vzpostavi visok električni potencial, zaradi česar naboji v raztopini težijo proti največjemu nasprotnemu polu, tj. proti ozemljenemu zbiralu. Elektrostatska sila preoblikuje kapljico v značilen stožec z zaobljenim vrhom, t.i. Taylorjev stožec. Temu nasprotuje površinska napetost raztopine, ki teži k zmanjšanju površine kapljice in vzdržuje njeno okroglo obliko. Zaradi majhne površine je gostota naboja na kapljici velika in sorazmerno s tem elektrostatska sila. To omogoča, da pri sobnih pogojih in z jakostjo nekaj kV steče proces ES. Ko z nadaljnjim večanjem potencialne razlike elektrostatska sila izenači in preseže površinsko napetost, iz vrha stožca proti zbiralu pospešeno izide tanek curek raztopine (slika 2) (5,9,10,16).



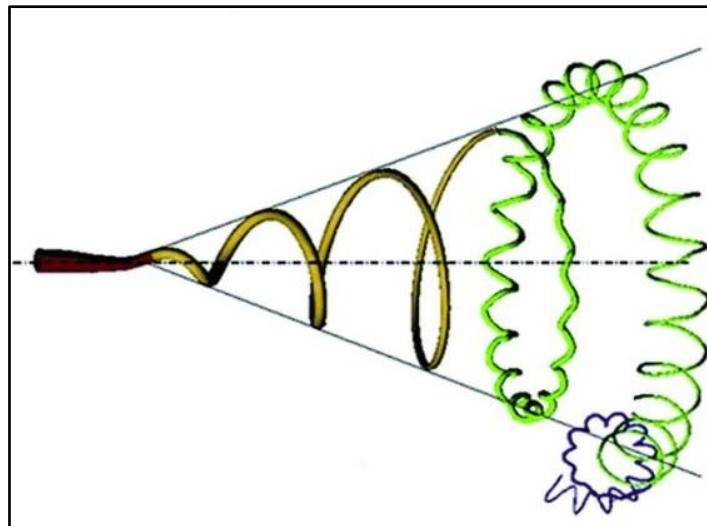
Slika 1: diagram osnovne postavitev naprave za elektrostatsko sukanje (17)

Elektrostatska sila iz kapljice vleče curek, ki se pri tem razteguje in tanjša, s površine pa pospešeno odpareva topilo, kar dodatno pripomore k zmanjšanju premera ter hkrati curek ohlaja in do določene mere stabilizira (5,18). V prvih nekaj centimetrih leta curek linearно sledi gradientu električnega polja. S tanjšanjem in izhlapevanjem topila se spreminja lastnosti curka; spremembe viskoelastičnih lastnosti, zmanjšanja upogibne togosti, kot tudi zgostitve naboja in njihove manjše mobilnosti, vse dokler v neki točki ne prevladajo coulombske odbojne sile med enakimi naboji. To vodi v nastanek t.i. krivinskih nestabilnosti, serije postopno manjših turbulentnih vijačenj okoli osi krivulje leta (slika 3) (10,19). Intenzivno bičanje močno pospeši raztegovanje curka in je dejansko ključen fizikalni pojav, ki omogoča več tisoč-kratno zmanjšanje premera iz začetnega milimetrskega curka do končnih nanometrskih dimenziij, v zgodj nekajcentimetrski razdalji od igle do zbirala (10,20,21). Ko topilo dokončno odpari, se raztezanje ustavi in na zbiralu se v naključnih smereh naložijo suha vlakna, s prostim očesom vidna kot enakomeren tanek nanos. Na poti do zbirala curek orisuje volumen stožca z vrhom pri začetku prve krivinske nestabilnosti in dnom na površini zbirala (10).



Slika 2: konica igle s kapljico polimerne raztopine in izhajajočim curkom (vir: J. Dolenc)

V literaturi je moč zaslediti mnoge vrste izvedb in različnih prilagoditev osnovne postavitev naprave za ES, z namenom odpraviti ali izboljšati pomanjkljivosti osnovne konfiguracije. Znana je postavitev naprave v zaprto komoro s kontrolirano atmosfero in temperaturo, kar nudi možnost bistveno boljšega nadzora okoljskih pogojev. Naprednejše postavitev so opremljene z elektronskim nadzorom in regulacijo električne napetosti ter pretoka raztopine, s čimer se lahko dinamično in avtomatizirano prilagajajo pogoji za ohranjanje Taylorjevega stožca znotraj nastavljenih okvirjev (22).



Slika 3: diagram krivinske nestabilnosti (10)

Posebnost predstavlja sukanje polimerne taline, pri kateri odpade potreba po uporabi topil, a je omejena z veliko tehnološko zahtevnostjo (potreba po uporabi vakuumske komore,

bistveno višjih napetosti, zagotavljanju stalne visoke temperature, minimalne dimenzijske sukanih vlaken omejene na mikrometrsko območje) (7).

Izrazita težava ES je nizka produktivnost. Ena od predlaganih rešitev zajema hkratno sukanje iz številnih vzporednih igel. S tem se vnaša dodatna raven zapletenosti, ki se lahko delno omili z uporabo pomožnih elektrod za stabilizacijo curka tekom leta (23), podobno kot se to uporablja pri elektrostatskem pršenju. Alternativni pristop predstavljajo vrste naprav, ki temeljijo na sukanju iz proste površine, brez uporabe igel. Poleg bistveno večje produktivnosti je sam proces s tem poenostavljen. Načini sukanja iz proste površine se pojavljajo v mnogih inovativnih izvedbah, navedenih v številnih objavah (15,24,25,26) in celo možnost sukanja vlaken tipa jedro-obloga s proste površine (27,28). Pomanjkljivost brezigelnega sukanja je manjša kakovost izdelanih NV (15), potreba po uporabi višjih napetosti in dražja naprava z manj možnostmi uravnavanja pogojev ES ter s tem lastnosti izdelanih NV.

1.4 PROCESNE SPREMENJLJIVKE

Nadzor procesa ES pomeni zagotavljanje stalnih pogojev za izdelavo neprekinjenih in gladkih NV, s čim ožjim odstopanjem povprečnega premera. Ena glavnih pomanjkljivosti metode je relativno visoka zapletenost, ki se kaže v nezanesljivi ponovljivosti. Proses je odvisen od številnih spremenljivk, od katerih so mnoge v medsebojni odvisnosti in jih lahko razdelimo na:

<u>Lastnosti raztopine</u>	<u>Nastavitve aparature</u>	<u>Pogoji okolja</u>
<ul style="list-style-type: none">• Vrsta polimera• Vrsta topila• Koncentracija polimera• Dodatki	<ul style="list-style-type: none">• Napetost oz. jakost polja• Razdalja konica igle - zbiralo• Premer in vrsta igle• Hitrost pretoka	<ul style="list-style-type: none">• Temperatura• Zračna vlažnost• Gibanje zraka

Vsaka sestava raztopine terja svoj nabor spremenljivk za procesno okno, v območju katerega dobimo stabilen curek in se tvorijo gladka NV. Ugotavljanje optimalnega nabora vseh spremenljivk (optimizacija) je zamudno in kljub izdatnim raziskovalnim naporom ter poizkusom postavitev matematičnih odvisnosti, večinoma ostaja na temelju empirije. Znotraj procesnega okna lahko s sprememjanjem posameznih parametrov do določene mere

prilagajamo morfologijo izdelanih NV. Vpliv takšnih sprememb je bil obširno predstavljen v objavljenih raziskovalnih delih (1,7,29,30,31,32).

1.4.1 Lastnosti raztopine

1.4.1.1 Sposobnost sukanja

Pri ES govorimo o t.i. sposobnosti sukanja (ang. electrospinability) in na splošno pomeni primernost raztopine za tvorbo NV. Ključen pogoj, da iz neke raztopine z ES nastanejo neprekinjena in gladka NV, je prisotnost zadostne količine čvrstih notranjih struktur, ki se lahko orientirajo v smeri električnega polja (33,34). V nasprotnem primeru se na vlaknih pojavijo napake ali pa pride celo do popolnega razbitja curka na posamezne drobne kapljice. Slednje se imenuje elektrostatsko pršenje (ang. eletrospraying) in je soroden tehnološki proces, ki ga uporabljam za izdelavo mikro- in nanodelcev. Stopnja prepletanja polimernih verig je odvisna od intrinzičnih kemijskih lastnosti polimera, molekulske mase oz. dolžine verig ter njihovih interakcij s topilom.

1.4.1.2 Izbor polimera in koncentracija

Izbira vrste materiala, ki bo sestavljalo ogrodje NV, predstavlja izhodišče pri postavljanju procesa in v največji meri določa mehanske lastnosti kočnega produkta. Pogojena je s predvidenim namenom uporabe in kompatibilnostjo morebitno dodanih učinkovin. Možna je kombinacija večih polimerov v isti raztopini, za sukanje kompozitnih vlaken ali vzporedno sukanje različnih disperzij v enotna, prepletajoča-se kompozitna ogrodja z dopolnjujočimi-se lastnostmi obeh gradnikov (2).

Raztopine s primernimi sposobnostmi sukanja dobimo zgolj z uporabo dolgoverižnih polimerov, katerih molekule prek medsebojnega prepletanja tvorijo viskoelastične raztopine z nelinearnimi reološkimi lastnostmi (35,36). Primeri uspešnega elektrostatskega sukanja NV, brez uporabe polimerov kot nosilnega materila, so redki. Do sedaj je znana zgolj uporaba ciklodekstrinov (37), ki so se izkazali kot uporaben dodatek za izboljšanje sposobnosti sukanja običajnih raztopin s polimerom (38).

Najprimernejša surovina za ES so linearni, dolgoverižni, neionogeni polimeri z malo funkcionalnimi skupinami, ki bi motili interakcije med verigami in bi dajali raztopini previsoko prevodnost. Znano je, da je sposobnost sukanja sinteznih polimerov načeloma boljša kot tistih naravnega izvora. Slednji so zanimivejši za biomedicinske aplikacije

zaradi podobne kemijske narave z makromolekulami človeškega telesa. Iz tega razloga se v praksi naravnim pogosto dodajajo še sintezni polimeri, da se tako izboljša sposobnost sukanja raztopine (2,9). Pri tem je pomembno, da zagotovimo dobro kompatibilnost med polimeri ali drugače preprečimo nastanek dvofaznih sistemov (39). Najpogosteje uporabljeni polimeri naravnega izvora vključujejo kolagen, hitosan, celulozni acetat, hitin, fibrinogen, hialuronsko kislino, fibroin svile, alginat in druge. Od sinteznih najpogosteje uporabljajo za izdelavo NV polivinil alkohol (PVA), poliuretan (PU), polietilen glikol (PEG), polikarbonat, poli(é-kaprolakton) (PCL), poli(mlečno kislino) (PLA), poli(glikolno kislino) (PGA), ali kombinacijo obeh slednjih (PLGA) (1,7).

Koncentracija polimera v raztopini za sukanje je ključna spremenljivka, ki v največji meri določa sposobnost sukanja zaradi viskoelastičnih lastnosti raztopine (36) in debelino nastalih vlaken (40).

1.4.1.3 Vrsta topila

Je primarno pogojena s topnostjo nosilnega polimera, kot tudi topnostjo predvidene učinkovine. Pomemben vidik prav tako predstavlja toksičnost oz. varnost. S svojimi intrinzičnimi lastnostmi (prevodnsot, viskoznost, površinska napetost, parcialni tlak, interakcije z nosilnim polimerom) je topilo eden ključnih dejavnikov za proces ES.

1.4.1.4 Dodatki

Površinsko aktivne snovi, elektroliti in druge spojine dodajamo z namenom spremnjanja končne morfologije NV ali izboljšanja sposobnosti sukanja. Na primer, površinsko aktivne snovi znižajo površinsko napetost in s tem povprečni premer vlaken. Dodatek soli poveča električno prevodnost raztopine, zaradi česar na curek v električnem polju deluje večja sila. Poveča se intenzivnost raztegovanja ter bičanja v fazi leta, posledično so vlakna tanjša (1).

Kot posebna vrsta dodatkov se lahko smatrajo učinkovine dodane neposredno v raztopino, z namenom vgradnje v NV, ki, glede na svojo kemijsko naravo, spremenijo lastnosti raztopine.

1.4.2 Nastavitev aparature

1.4.2.1 Električno polje

Za ES je pomembna jakost samega polja, ne napetost na igli kot taki, vendar avtorji v literaturi iz praktičnih razlogov navajajo zgolj slednjo. Napetost potrebna za ohranjanje

stabilnega curka je manjša od napetosti potrebne za njegovo sprožitev, ki mora premagati površinsko napetosto raztopine (5). Ob preveliki napetosti postaneta Taylorjev stožec in curek nestabilna (1). Reneker in Chun sta pokazala, da električno polje ne vpliva bistveno na premer vlaken pri elektrostatskem sukanju polietilen oksida. Nasprotno trdita Demir in Zhang s skupinama, namreč da se ob večji napetosti iz kapljice vleče večja količina raztopine, zaradi česar je začetni curek sicer debelejši, a je hkrati raztegovanje ter bičanje v fazi leta intenzivnejše, kar posledično povzroči nastanek tanjših vlaken (7). Tako lahko preko uravnavanja jakosti električne napetosti relativno enostavno vplivajo na debelino in s tem posredno na kinetiko sproščanja zdravilne učinkovine, če je ta vgrajena v ogrodje NV (1).

1.4.2.2 Pretok

Hitrost dovajanja raztopine mora biti takšen, da se na konici igle ohranja kapljica primerne velikosti. Nadomeščati mora količino raztopine porabljene pri sukanju, brez kapljanja. Primernejša je manjša kapljica, iz katere še lahko nastane Taylorjev stožec, kajti na večji se pogosto pojavijo sekundarni izvori curka, kar vodi do neenakomernih velikosti NV. Vpliv pretoka na samo morfologijo vlaken je neznaten, z izjemo kadar je igla postavljena pravokotno nad vodoravno ležeče zbiralno (1).

1.4.2.3 Razdalja konica igle – zbiralno

Pomeni pot in s tem čas leta curka, zato jo prilagajamo predvsem glede na hlapnost topila. Na zbiralnu se morajo nalagati suha vlakna, v nasprotnem primeru se pojavijo različne deformacije NV, npr. sploščitve ali sprijeta vlakna (6,7). Z oddaljenostjo od izvora napetosti (konice igle) se prav tako zmanjšuje jakost električnega polja.

1.4.2.4 Igla

Premer mora biti manjši od kapljice, a dovolj velik, da lahko tekočina še vedno teče. Mnenja o vplivu velikosti igle na proces ES se v literaturi razlikujejo. Nekateri menijo, da izbira velikosti vpliva na premer vlaken, spet drugi so zaključili, da povezava med premerom igle in vlakni ne obstaja (1,41).

1.4.2.5 Zbiralo

Poleg razdalje in napetosti na izvoru zbiralno s svojo obliko in površino vpliva na jakost električnega polja. V najosnovnejši izvedbi je zbiralno enostavno ploščato stojalo, obdano s

prevodnim materialom, na katerem se nabirajo NV v obliki netkane mreže. Za nekatere posebne aplikacije je potreba po izdelavi vlaken z usmerjeno ureditvijo, tako imenovana vzporedna nanovlakna. Urejenost nanovlaken je posebej pomembna za aplikacije, namenjene za podporo živim celicam, ki se specifično odzivajo glede na topografske lastnosti površine (42). Za izdelavo vzporednih nanovlaken uporabljajo vrteča zbirala v obliki valjev ali pravokotno postavljeni elektrode.

1.4.3 Pogoji okolja

1.4.3.1 Temperatura

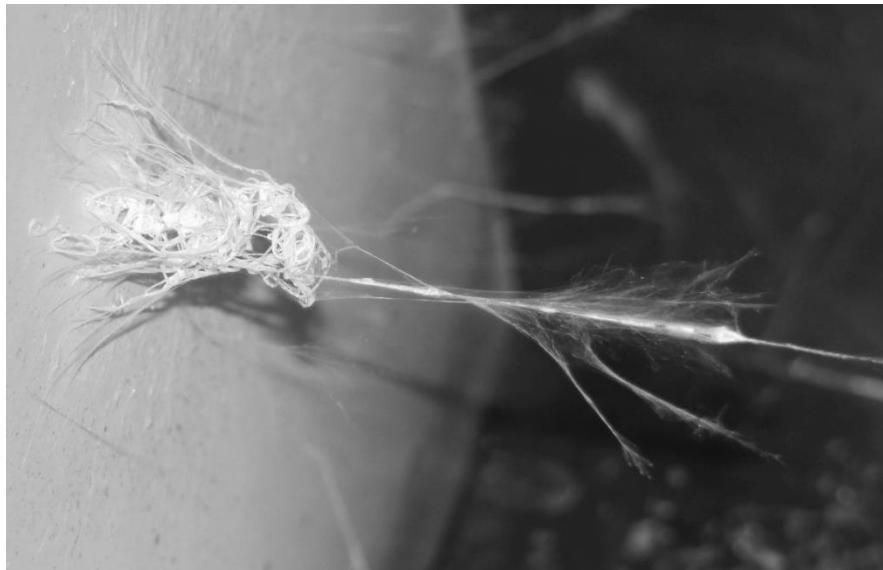
Temperatura vpliva na proces ES posredno preko drugih lastnosti, ki so v temperaturni odvisnosti (viskoznost, površinska napetost, hitrost odparevanja topila, mobilnost molekul v električnem polju idr.) (1). V praksi ES največkrat izvajajo pri sobni temperaturi. Visoka temperatura je lahko problematična, kadar imamo opravka z občutljivimi makromolekulami, nizka pa lahko vodi do težav zaradi pojava rosišča.

1.4.3.2 Relativna vlažnost

Pri zračni vlažnosti so nihanja med skrajnimi vrednostmi normalna posledica vremenskih sprememb. Zračna vlažnost ne vpliva neposredno na električno prevodnost zraka in pri napetostih, ki se običajno uporabljajo za ES, je razelektritev zraka malo verjetna (43). Namesto tega spreminja predvsem hitrost odparevanja topila. Učinek na morfologijo vlaken je odvisen od hidrolipofilne narave raztopine. Pri hidrofobnih topilih se ob visoki nasičenosti zraka tvorijo pore (7), pri hidrofilnih raztopinah pa spremeni premer NV. Pelipenko s sodelavci je pokazal, kako lahko zgolj z natančnim reguliranjem zračne vlažnosti spremojmo premer visoko hidrofilnih polivinil alkoholnih NV (44). Ne glede na sestavo na splošno velja, da ob nizki vlažnosti nastajajo debelejsa vlakna, medtem ko pri višji nastajajo tanjša, z bolj heterogeno dimenzijsko porazdelitvijo. Razlika v parcialnem tlaku topila in okoliškega zraka je gonilo za uparevanje topila. Z naraščanjem nasičenosti zraka ta razlika pada, topilo odpareva počasneje in raztezanje nastajajočega vlakna poteka dlje (45).

Ob skrajnih vrednostih zračne vlage je proces ES popolnoma onemogočen. V primeru suhega okolja prihaja do prezgodnjega strjevanja ali pa se raztopina posuši že na igli in jo zamaši. Pri visoki relativni vlagi je izhlapevanje topila onemogočeno in na zbiralo se nalagajo še vedno mokra polimerna vlakna, ki še vedno vsebujejo dovolj topila, da lahko

prevajajo električni tok. V določenih skrajnih primerih se na zburalu namesto tankega in povsem ravnega nanosa, lahko prične nabirati skupek grobo urejenih, s prostim očesom vidnih niti. Elektrostatski naboje se nabere na konicah skupkov, ki se orientirajo v smeri nazaj proti izvoru električnega polja. Hkrati se na konicah še naprej nabira groba polimerna nit, ki tako raste od zbirala proti igli, vse dokler ne pride do stika z izvorom. Električni tok nekajkrat naraste in nastanek nanovlaken je dokončno onemogočen (slika 4). V literaturi je bil takšen pojav v enem primeru pripisan uporabi previsoke napetosti (46), v drugem pa se omenja pri sukanju polianilina ob normalnih oz. optimalnih procesnih pogojih. Polianilin je namreč eden redkih polimerov, ki dobro prevaja električni tok in se zato smatra kot prevodnik (10).



Slika 4: skupek PVA vlaken z dodanim natrijevim ibuprofenatom, ki sega od zbirala proti igli in je nastal pri elektrostatskem sukanju ob previsoki zračni vlažnosti (nad 78%) (vir: J.Dolenc)

1.5 MORFOLOGIJA NANOVLAKEN

Cilj ES je izdelati gladka nanovlakna s čim ožjo razporeditvijo premerov. Vozli (ang. beads) so ena izmed najpogostejših napak, ki se pojavljajo pri elektrostatsko sukanih NV. Pod elektronskim mikroskopom so vidni kot »kroglice na vrvici«, ponavljajoče-se okrogle ali delno podolgovate zadebelitve, povezane s tankimi nitmi. Debelina NV z vozli je zelo

neenakomerna in ker je njihovo velikost ali razporeditev težko nadzorovati, je pojav nezaželen (47). Vozli nastanejo, če tekom sukanja NV površinska napetost prevlada nad viskoznostjo oz. pride do porasta elastične komponente G' glede na plastično komponento G'' , kar privede do kapilarnega razpada curka (Rayleighova nestabilnost) (16,47,48).

Pojavu vozlov se je moč izogniti z izboljšanjem sposobnosti sukanja, torej s povečanjem koncentracije ali molekulske mase nosilnega polimera. Podoben učinek lahko dosežemo, če povečamo viskoznost raztopine, npr. z dodatkom soli. Ker je glavno gonilo za nastanek vozlov površinska napetost, vključitev površinsko aktivne snovi pripomore k njihovi odpravi (1). Podobno dosežemo z dodatkom elektrolita. Ta poveča gostoto nabojev, ki se med seboj odbijajo in težijo k povečanju površine curka (47,49). Reneker je slednje elegantno dokazal v poskusu z dodatno elektrodo, postavljenou pred zbiralom in pravokotno na curek. V poskusu so nastajala gladka vlakna, vse dokler se ni vključila sekundarna elektroda, ki je nevtralizirala naboje na curku in so se pojavili vozli (47). Do vozlov lahko privede tudi uporaba previsoke napetosti na igli (1) ali visoka relativna vlažnost oz. nizek parcialni tlak topila (10).

1.6 VGRAJEVANJE UČINKOVIN V ELEKTROSTATSKO SUKANA NANOVLAKNA

Izredna prilagodljivost metode ES se kaže pri različnih možnih načinih vgradnje zdravilnih učinkovin in profilov sproščanja, ki jih lahko s tem dosežemo. Izbor surovin, procesnih spremenljivk ter način vgradnje določajo mehanizem oz. kinetiko sproščanja (50,51). Nanjo vplivajo tako fizikalni kot kemijski dejavniki: narava polimera (molekulska masa, kristaliničnost), narava spojine, njena razporeditev in aktivnost, morfologija površine, velikost vlaken, poroznost, kot tudi sama debelina nanosa ter delež hidrofilnih/lipofilnih polimerov v ogrodju. Z ES so izdelali NV z različnimi profili sproščanja učinkovin: takojšen, enakomeren, pulzirajoč, zadržan ali bifazni. Raznolike učinkovine od antibiotikov, protitumornih učinkovin, proteinov, aptamerov, DNK in RNK so bile vključene v elektronsukana NV (52). Glavni mehanizem sproščanja zravilne učinkovine iz ogrodja NV je difuzija, nekateri pa navajajo tudi desorpcijo (51). Če je ogrodje razgradljivo oz. vodotopno, sproščanje pospešuje tudi erozija.

1.6.1 Enostavno mešanje

Najpreprostejši ter daleč najpogosteje uporabljen način vgradnje je raztpljanje učinkovine v raztopini za sukanje skupaj z nosilnim polimerom. Učinkovina je enakomerno dispergirana v ogrodje vlaken nanometrskih dimenzij. Zaradi izredno kratkega časa do nastanka suhih vlaken, se učinkovina večinoma nalaga v amorfni obliki (50), kar poveča hitrost raztpljanja in je sproščanje enake učinkovine bistveno hitrejše iz NV kot iz enakovrednih filmov (53). Elektrostatsko sukana NV z enostavnim mešanjem polimera in učinkovine predstavlajo idealen dostavni sistem za takojšnje sproščanje ali še pomembnejše, za izboljšanje biološke uporabnosti 40-50% novih spojin (ang. NCE – new chemical entity), ki spadajo v II ali IV kategorijo po BCS klasifikaciji in so v vodi praktično netopne (54).

1.6.2 Emulzije in nanosuspenzije

Če želimo izdelati sistem s podaljšanim sproščanjem za dobro vodotopno učinkovino, moramo uporabiti katerega od v vodi stabilnih polimerov, ki pa so ponavadi hidrofobni in niso kompatibilni z vodotopnimi snovmi. Po drugi strani so organska topila, ki bi jih uporabili za raztpljanje lipofilnih učinkovin, neželena z vidika varnosti. V teh primerih sukanje iz enotne raztopine ni mogoče. Namesto tega lahko uporabimo večkomponentni disperzni sistem. Elektrostatsko sukanje emulzije tvori vlakna z vozli, v katerih se nahaja notranja faza. V nekaterih primerih se lahko tekom sukanja dispergirana faza orientira in zlije v sredini vlaken v povezano jedro, ki je obdano z nosilnim polimerom. Učinkovina se nahaja v kompatibilni fazi jedra, obloga pa predstavlja za difuzijo omejujočo (ang. rate-limiting) bariero. Dobimo obložena nanovlakna tipa jedro-obloga (55,56), ki predstavljajo naprednejšo obliko NV s številnimi prednostmi: učinek izbruha se močno zmanjša, izognemo se potrebi po skupnem topilu za polimer in učinkovino, molekule občutljive za organska topila (npr. DNK ali proteini) lahko sukamo v vodi obstojna vlakna. Jing s sodelavci je poročal o pripravi kompozitnih vlaken tipa jedro-obloga s sukanjem emulzije v/o z enostavno iglo, kjer so uporabili polietilen oksid (PEO) raztopljen v vodi kot notranjo fazo in amfifilni diblok kopolimer polietilen glikol-poli mlečna kislina (PEG-PLA) raztopljen v kloroformu za zunanjou fazo (52).

Kot zanimiva strategija se je izkazalo sukanje raztopine z dodanimi nanodelci učinkovine. Slednja v tako izdelanem ogrodju ohrani izboljšano topnost, a ker se delci ne raztopljujo, je vpliv dodatka na sposobnost sukanja raztopine in končno morfologijo vlaken minimalen,

medtem ko je sproščanje podaljšano in učinek izbruha zadušen (57). Alternativni način vgradnje nanodelcev neposredno v NV je hkratno elektrostatsko sukanje vlaken in elektrostatskim razprševanjem nanodelcev v enotno ogrodje (2).

1.6.3 Koaksialno sukanje

NV tipa jedro-obloga je prav tako mogoče izdelati z uporabo posebne šobe, ki je sestavljena iz dveh igel različnih velikosti, koncentrično postavljenih ena znotraj druge. To omogoča hkratno sukanje dveh raztopin v eno, dvoslojno vlakno: notranjega, ki sestavlja jedro ter zunanje, ki tvori oblogo (28,56,58). S koaksialno šobo enostavno nadzorujemo debelino bariere in tako spremojamo hitrost sproščanja učinkovine iz jedra. Bistvena pomanjkljivost koaksialne šobe je dodatna raven kompleksnosti in s tem težji nadzor procesa. Moreno in sodelavci je z uporabo koaksialne šobe dosegel enomesečno podaljšano sproščanje encima laktat dehidrogenaza iz polivinil alkoholnih NV. Encim, ki raztopljen v tris-HCl pufru sam po sebi ne bi bil primeren za izdelavo NV, je znotraj PVA oblage ohranil katalitično funkcijo (59).

1.6.4 Kovalentna vezava

Poprocesna površinska funkcionalizacija označuje kemijsko ali fizikalno obdelavo že izdelanih NV. Uporabljajo jo predvsem za upočasnitev in podaljšanje sproščanja učinkovine preko stabilizacije vodotopnih vlaken. Čeprav je nalaganje učinkovine na površino omejeno z nizko kapaciteto vgradnje, je površinska funkcionalizacija zanimiva za aplikacije v tkivnem inženirstvu. Biološke molekule adsorbirane ali kemijsko vezane na površino drugače inertnih sinteznih polimerov, lahko oponašajo določene celične signale (1,58).

Najenostavnejša metoda površinske funkcionalizacije polimernih NV je inkubacija (namakanje) v raztopini z učinkovino, ki se pri tem adsorbira na površino NV in veže s šibkimi Van der Waalsovimi silami, elektrostatskimi ali hidrofobnimi interakcijami ter vodikovimi vezmi. Učinkovitost adsorbcije na površino hidrofobnih NV se lahko izboljša z zračno plazmo, ki jo naredijo bolj hidrofilno in omogočijo boljšo infiltracijo vodnih raztopin. Prednost inkubacije je enostaven in blag postopek, ki ne poškoduje občutljive strukture NV. Na primer, pri namakanju v simulirano človeško plazmo, se površina obloži z nanokristaliničnim apatitom za izražanje osteogenih genov v osteoblastih (58).

Učinkovino lahko na površino NV vežemo tudi kovalentno, za kar je potrebna prisotnost ustreznih funkcionalnih skupin na polimernih verigah, najpogosteje karboksilne in aminske (52). Zanimiva strategija je na primer vezava rastnih faktorjev preko vmesnih ('linkerskih') molekul heparina. Pogoj je prisotnost reaktivne aminske skupine na molekulskeih verigah NV. Rastni faktorji se vežejo preko številnih anionskih sulfonskih skupin heparina, s čimer se ohrani njihova biološka aktivnost ter jih hkrati zaščiti pred denaturiranjem zaradi toplotne, proteolitično encimsko razgradnjo ali inaktivacijo v kislem pH okolju. Enostavna fizikalna adsorbcija rastnih faktorjev povzroči hipno sproščanje celotne vsebine, sproščanje iz heparinskih linkerjev pa lahko traja več tednov (60).

1.7 UČINEK IZBRUHA

T.i. učinek izbruha (ang. burst effect) je pogost pojav pri nano farmacevtskih sistemih z veliko površino na enoto mase, kot so nanosfere, liposomi, pa tudi elektrostatsko suhana NV. Gre za hitro sprostitev znatnega deleža vgrajene učinkovine v prvih nekaj minutah po stiku z medijem, čemur ponavadi sledi faza počasnega in enakomernega sproščanja (61).

Za večino zdravil poteka absorpcija zmerno počasi v želodcu, hitro v proksimalnem delu črevesja in ostro pade v distalnem predelu. Posledično tudi farmacevtska oblika z 0. redom *in vitro* sproščanja ne more zagotoviti konstantne plazemske koncentracije. Dostavní sistem, ki bi izkazoval hiter začetni porast in s tem hitrejše doseganje terapevtskih plazemskih koncentracij, bi predstavljal ugodnejšo rešitev, še posebej pri uporabi antibiotikov (62). Kljub temu je učinek izbruha načeloma nezaželen pojav, saj ga je v praksi težko količinsko napovedati ali kakor koli natančno nadzorovati, poleg tega v primerih spojin z visoko jakostjo farmakološkega učinka predstavlja potencialno tveganje (61). Začetni izbruh je predvsem značilen za NV, ki imajo učinkovino vgrajeno z enostavnim mešanjem in je posledica izpiranja molekul z in blizu površine. Slenja je pri NV izredno velika in je pojav zato toliko izrazitejši. Tekom nastajanja z ES se učinkovina, v raztopini ponavadi v ionski obliki, koncentrira na oz. blizu površine curka zaradi odbojev med enakimi naboji ter večjo mobilnostjo v primerjavi z dolgovertižnimi makromolekulami nosilnega polimera (47). Pomemben vzrok za obseg učinka izbruha je tudi kompatibilnost oz. topnost učinkovine v raztopini nosilnega polimera. Zeng s sodelavci je izdelal lipofilna poli(L-laktid) (PLLA) nanovlakna z vgrajeno protitumororno učinkovino doksorubicin, ki je

bila dodana v dveh oblikah: kot hidrofilna HCl sol in kot prosta baza. Hidrofilna sol je z raztopino polimera tvorila suspenzijo, medtem ko se je lipofilna baza raztopila skupaj s polimerom v mešanici kloroforma in acetona. Sproščanje v vodni medij za vlakna izdelana iz suspenzije je pokazalo več kot 70% takojšnjo sprostitev dokSORubicina, medtem ko je bila ta pri vlaknih izdelanih iz raztopine zgolj 20% (50).

Učinku izbruha se je moč izogniti oz. ga omiliti z uporabo formulacij polimer-topilo, ki so z učinkovino dobro kompatibilne. Pri kompleksnejših vrstah NV tipa jedro-obloga izbruh onemogoča za difuzijo omejujoča bariera (63).

2 NAMEN DELA

Kljub relativni dostopnosti ES, ostaja slaba ponovljivost ena njenih glavnih pomanjkljivosti. Metodo pogojujejo številne spremenljivke raztopine in nastavitev aparature, kot tudi vplivi okolja, od katerih so mnoge v medsebojni, pogosto nelinearni odvisnosti.

Cilj raziskav v okviru moje diplomske naloge je proučevanje elektrostatskega sukanja in razvoj postopka za izdelavo neprekinjenih, gladkih vlaken iz polivinil alkohola, s premerom nanometrskih dimenzij, s čim ožjim variiranjem debeline ter enakomerno vgrajeno modelno zdravilno učinkovino. Eksperimentalno proučevanje bo temeljilo na delu preteklih raziskovalnih nalog opravljenih na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani (64,65,66). Izdelana NV bomo nadalje uporabili pri razvoju *in vitro* metode za določanje sproščanja. To bo vključevalo naslednje faze:

1. Postavitev ustreznih procesnih parametrov za elektrostatsko sukanje raztopine pri izbrani koncentraciji PVA.
2. Vgraditev modelne učinkovine v različnih koncentracijah (1-20%) in optimizacija procesnih parametrov za nove raztopine.
3. Vrednotenje izdelanih nanovlaken s SEM analizo.
4. Razvoj *in vitro* metode za sproščanje učinkovine.
5. Priprava vzorcev NV za sproščanje.
6. Sproščanje učinkovine iz NV po postavljeni *in vitro* metodi in analiza z UV-VIS spektrofotometrijo.
7. Statistična analiza ponovljivosti na podlagi rezultatov sproščanja.
8. Obravnava najpogostejših napak in možnosti njihove odprave oz. zmanjšanja.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Surovine za izdelavo polimernih nanovlaken:

- Polivinil alkohol Mowiol® 20-98, Mr=125.000 g/mol, stopnja polimerizacije: 2800, stopnja hidrolize: 98·0- 98·8%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Prečiščena voda
- Natrijev ibuprofenat, Mr=228·29 g/mol, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemčija

Postavitev aparature za elektrostatsko sukanje:

- 20 mL brizge, B-Braunn, ZDA
- Kovinska igla z notranjim premerom 0,8 mm, Linari Engineering, Italija
- Črpalka Razel TM, Ma R-99E, Italija
- Generator visoke napetosti Linari Engineering s.r.l., Ma. P60-R-EU, Italija

Reagenti za pripravo fosfatnega pufra s pH≈7,4:

- Natrijev klorid (>99,5%), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev klorid (>99,5%), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- Dinatrijev hidrogenfosfonat (>99,0%), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev dihidrogenfosfat (>99,5-100,5%), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hidroksid (>99,0%), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- Prečiščena voda

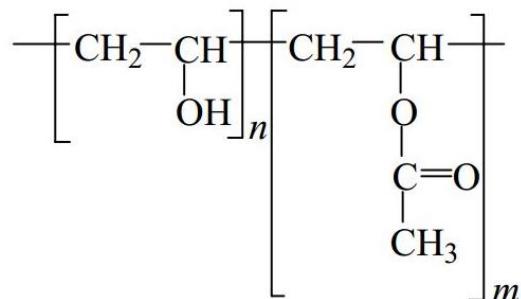
Ostale aparature in reagenti:

- Analitska tehnica, Metter Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- Digitalna tehnica, Sartorius M-pact, Sartorius Group
- Magnetno mešalo, Rotamix 560 MMH, Tehnica, Železniki, Slovenija

- Acetonitril (>99,9%) Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- Avtomatska pipeta, 500-5000 µL
- Spektrofotometer, Hewlett Packard 8453, Agilent Technolgoies, Nemčija
- Centrifugirke, 10 mL
- Vortex stresalnik

3.1.1 Polivinil alkohol

Polivinil alkohol (PVA) pridobivajo s polimerizacijo vinil acetata z nadzorovano hidrolizo estrskih ostankov ob pristotnosti alkalnega katalizatorja (saponifikacija). Končni produkt se pojavlja v obliki zrnc ali praška prosojne, bele ali mlečnate barve, brez vonja ali okusa. Komercialno je PVA na voljo kot družina surovin, ki se med seboj razlikujejo v molekulski masi oz. stopnji polimerizacije in deležu hidroliziranih estrskih ostankov (slika 5) ter s tem v fizikalno-kemijskih lastnostih: temperatura tališča, temperatura steklastega prehoda, stopnja kristaliničnosti, vodotopnost, reološke lastnosti v raztopini itd. (39,67).



Slika 5: strukturna formula delno hidroliziranega PVA

3.1.1.1 Uporaba v industriji

Uporaba PVA je pestra in obsega številna področja, tako v papirni, tekstilni in gradbeni, kot tudi prehrambeni, kozmetični ter farmacevtski industriji, kjer se uporabja v topikalnih in oftalnih formulacijah, npr. v umetnih solzah, obraznih maskah, v raztopinah za kontaktne leče, transdermalnih obližih, rekonstrukcijski kirurgiji ter mnogih drugih oblikah medicinskih pripomočkov. Uporablja se kot emulgator za stabilizacijo emulzij in drugih koloidnih sistemov, kot zgoščevalec, vezalec, za površinsko oblaganje, sestavina

prehrambene embalaže in druge uporabe (39,67,68,69). PVA odlikujejo visoka kemijska in fizikalna odpornost, dobre barierne lastnosti za kisik in vodo ter odlična sposobnost tvorbe filmov.

3.1.1.2 Varnost

Varnost PVA je bila izčrpno raziskana in dokazana v številnih raziskavah. PVA je biokompatibilen, netoksičen, nekancerogen, nemutagen ali drugače škodljiv polimer. Fiziološko je praktično inerten, ne draži kože ali sluznic in se slabo absorbira iz prebavnega trakta. Čeprav so neposredne študije na ljudeh redke in omejene na dermatološke teste, dolgoletna uporaba v farmacevtski in prehrambeni industriji ni razkrila škodljivih vplivov na ljudi (39,67,69,70). PVA je najbolj biološko razgradljiv od vinilnih polimerov (71) in se v odpadnih vodah z mikroorganizmi popolnoma razgradi do CO₂ in vode (39). Kot sestavina formulacij filmskih oblog za tablete in kapsule ima PVA pridobljen status GRAS (ang. generally recognized as safe) (69).

3.1.1.3 Topnost

Narava polimerov onemogoča določitev nasičene raztopine, tj. maksimalne koncentracije neke snovi v topilu, pri kateri še ne pride doobarjanja. Pri polimerih je teoretično mogoče izdelati raztopino poljubne koncentracije, z upoštevanjem viskoznosti raztopine, pri kateri je še mogoče normalno rokovanje. Topnost polimerov je tako določena kot količina, ki se raztopi pri določeni temperaturi in v določenem času z uporabo primerljive aparature/vsebnika (39).

Daleč najpogosteje topilo za PVA predstavlja voda. Je zelo hidrofilen polimer, ki v vodi gelira (predvsem dalj časa stoeče, popolnoma hidrolizirane oblike v višjih koncentracijah), a ne deluje higroskopno (31). Topnost v vodi je zapletena in močno odvisna od stopnje polimerizacije in deleža hidroksilnih ostankov, ki določajo jakost inter- ter intramolekularnih interakcij. Čeprav slednji delujejo hidrofobno, hkrati ovirajo tvorbo vodikovih vezi med hidroksilnimi ostanki (39). Topnost pada z večanjem Mw kot tudi manjšanjem prostih hidroksilnih skupin. Tako so popolnoma hidrolizirane oblike v vodi praktično netopne pri sobni temperaturi, pri 40-60°C nabrekajo in se zares raztapljajo šele pri temperaturi 90°C. Raztopina PVA je kinetično stabilna; z ohladitvijo na sobno temperaturo se polimer neobarja (39). Poleg vode je PVA relativno dobro topen še v visoko polarnih hidrofilnih topilih: dimetil sulfoksid (DMSO), N-metil pirolidon (NMP),

acetamid, formamid in dimetilformamid, fosforna kislina trisdimetilamid, dietilen triamin (31,39). V mono in multivalentih alkoholih kot so metanol, etanol, glicerol, etilen glikol, di- in trietilen glikol, nekatere oblike PVA nabrekajo, vendar se ne raztapljajo. Ne glede na stopnjo hidrolize je PVA popolnoma netopen v acetaldehidu, acetonu ali drugih organskih topilih (67). PVA deluje kot površinsko aktivna snov, a zgolj pri koncentracijah do 0,25%, ki pa se pri ES ne uporablja (39).

3.1.1.4 PVA kot surovina za elektrostatsko sukanje

Polivinil alkohol predstavlja idealno surovino za elektrostatsko sukanje nanovlaken. Linearna polimerna struktura nadzorovanega sinteznega izvora z možnostjo tvorbe močnih medmolekulskeh vezi daje odlično sposobnost sukanja v vodni raztopini, pri čemer imajo NV izdelana iz PVA dobre mehanske lastnosti. Iz teh razlogov se PVA dodaja drugim polimerom, ki imajo samostojno manj ugodne mehanske lastnosti ali se težje sukajo, predvsem tistim naravnega izvora, npr. k hitosanu, alginatu ali hialuronski kislini. Izbor oblike z različnimi stopnjami polimerizacije ali hidroliziranih acetatnih ostankov nudi možnost natančnega prilagajanja surovine potrebam, hidroksilne skupine pa nudijo možnost funkcionalizacije (53). Poleg že omenjene varnosti in biokompatibilnosti, vodotopnost odpravlja potrebo po uporabi potencialno toksičnih organskih topil.

Nekaj primerov uporabe PVA v NV: dostavni sistemi z ultra-hitrim sproščanjem (53), visokoobčutljivi električni senzorji (72), vodni filtri za adsorbcijo virusov (73), UV-odzivna vlakna za uporabo v optičnih napravah (74), izdelava magnetnih nanovlaken (75), naprednih ogrodij za gojenje celic (76), tkivnih nadomestkov (77), kot obloga za rane (78), komponente gorivnih celic (79), člen v baterijah (80).

3.1.1.5 Stabilizacija PVA

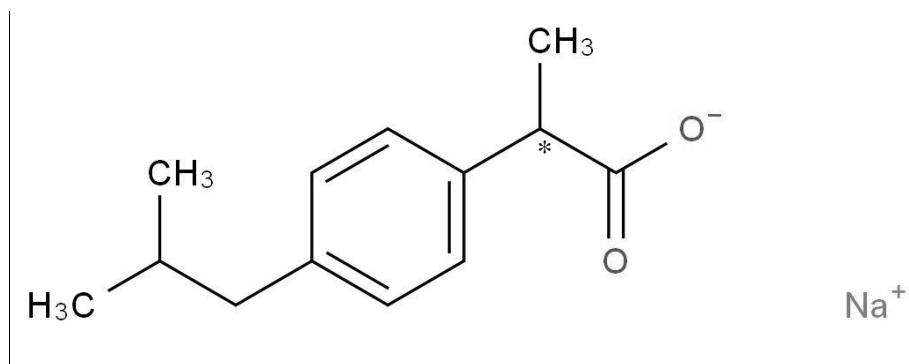
Struktura PVA nudi možnost postprocesne modifikacije nanovlaken za izboljšanje stabilnosti v vodi. To je moč doseči s kemijskimi ali fizikalnimi metodami. Med prve spada premreženje z glutaraldehidom, acetaldehidom, epiklorhidrinom, formaldehidom ali drugimi monoaldehydi ob prisotni žvepleni kislini ali metanolu za tvorbo acetalnih mostov. Fizikalna stabilizacija zajema obsevanje z visokoenergijskimi elektroni oz. fotoni (β in γ sevanje). Če vodno raztopino PVA zamrzemo do -20°C, segrejemo nazaj na sobno temperaturo in to nekajkrat ponovimo, se v strukturi hidrogela pojavijo delno kristalizirana območja (kristaliti). Podoben učinek ima segrevanje PVA hidrogelov pri temperaturi med

steklastim prehodom in tališčem (okoli 150°C). S tem se poveča mobilnost polimernih verig in omogoči tvorbo vodikovih vezi med –OH skupinami. Fizikalno premreženi PVA hidrogeli izkazujejo povečano odpornost proti raztplavljanju v vodi, hkrati z izboljšano mehansko trdnostjo v primerjavi z kemijskim premreženjem (68,81,82,83). Poleg podaljšanja sproščanja se s stabilizacijo PVA vlaken omili pojav učinka izbruha. Kenawy s sodelavci je poročal o izničenju prekomernega začetnega izbruha ketoprofena po obdelavi z metanolom (84).

3.1.2 Natrijev ibuprofenat

Natrijev ibuprofenat (NaIBU) je natrijeva sol ibuprofena (slika 6), ene najpogosteje uporabljenih nesteroidnih protivnetnih učinkovin z analgetičnim, antipiretičnim in protivnetnim učinkom. Mehanizem delovanja poteka preko neselektivne inhibicije encimov ciklooksigenaze, ki pretvarjajo arahidonsko kislino v prostaglandine, mediatorje za bolečino, vnetje in vročino. Prosta baza je slabo vodotopna (0,021 mg/mL pri 25°C), natrijeva sol pa zelo hidrofilna in se v vodi razaplja do nasičene topnosti 100 mg/mL (85,86).

V Sloveniji je ibuprofen na voljo v različnih odmerkih (150 oz. 200 mg do 800 mg za peroralne, 10 mg za intravenske aplikacije) ter v farmacevtskih oblikah: tablete, obložene tablete, filmsko obložene tablete, mehke kapsule, peroralne suspenzije, tablete s podaljšanim sproščanjem, šumeča zrnca, kapsule s podaljšanim sproščanjem, svečke, geli, krema in raztopine za injiciranje (87).



Slika 6: strukturna formula natrijevega ibuprofenata

3.2 POSTOPKI IN METODE

3.2.1 Izbor surovin

Za izdelavo NV smo izbrali polivinil alkohol (PVA), netoksičen, vodotopen in biokompatibilen sintezni polimer z relativno enostavno kemijsko strukturo. Kot eden najbolje raziskanih in najpogosteje uporabljenih polimerov za ES, je za njegovo uporabo na voljo bogata zbirka strokovne literature. Uporabili smo popolnoma hidrolizirano obliko (98-99%), z visoko povprečno molekulske maso (125.000 g/ml) in stopnjo polimerizacije (2800), ki ima zaradi odlično sposobnost sukanja. Kot modelno učinkovino smo uporabili v vodi zelo dobro topno natrijevo sol ibuprofena. Odlična vodotopnost je pomembna za ohranjanje sink pogojev.

3.2.2 Preliminarna postavitev procesnih pogojev

Za začetni nabor procesnih parametrov smo uporabili podatke raziskovalnega dela o lastnostih PVA raztopin in procesnih spremenljivkah potrebnih za njihovo uspešno tvorbo v NV, ki je bilo do sedaj opravljeno na naši fakulteti. Glede na pretekle raziskave (48,65,66) bom za sukanje PVA uporabili naslednje parametre:

- Koncentracija polimera: 8%
- Premer igle: 0,8 mm
- Površina zbirala: 23 cm x 17,5 cm
- Oddaljenost konica igle-zbiralo: 15 cm
- Napetost: 10-20 kV
- Pretok: 0,42 mL/h - 0,990 mL/h

3.2.3 Priprava raztopin za sukanje

Na tem mestu je potrebno poudariti pomembno razliko v nadaljnem navajanju koncentracij. Količina polimera v raztopini je ključnega pomena za uspešnost sukanja NV, medtem ko je vsebnost učinkovine predvsem pomembna s stališča jakosti farmakološkega učinka, torej njene koncentracije v končni farmacevtski obliki, v tem primeru suhih NV. V nadaljevanju se zato posamezne formulacije večinoma navajajo po vsebnosti NaIBU v izdelanih NV.

Za pripravo vzorcev NV smo najprej pripravili koncentrirano 12% raztopino PVA, ki smo jo uporabili za izdelavo posameznih 8% PVA raztopin z dodano modelno učinkovino v

različnih koncentracijah in sicer 1%, 5%, 10% ter 20%, glede na teoretično maso suhih vlaken. Preračunano na celokupno maso raztopin za sukanje, so koncentracije učinkovine v njih znašale 0·10%, 0·50%, 1·01% in 2·04%. Eno raztopino namenjeno za sukanje referenčnih vzorcev smo pustili prazno brez dodane učinkovine, zgolj 12% PVA razredčen z destilirano vodo na 8%. Deleži posameznih komponent raztopin za sukanje NV so predstavljene v pregldnici I.

Preglednica I: ponazoritev deležev posameznih komponent v raztopinah in suhih vlaknih

Delež snovi (m/m)	V raztopini za sukanje (%)	V suhih vlaknih (%)			
PVA	8	99	95	90	80
NaIBU	0,10	1			
	0,50		5		
	1,01			10	
	2,04				20

Začetno koncentrirano raztopino PVA smo pripravili z natančnim natehtanjem PVA granul, ki smo jih počasi kvantitativno prenesli v erlenmajerico napolnjeno s primerno količino prečiščene vode in dodanim magnetnim mešalom. Čašo smo postavili v vodno kopel in jo pokrili, da smo preprečili prekomerno izhlapevanje topila. Magnetno mešalo je preprečilo sprijemanje granul v skupke, enakomerno segrevanje na vodni kopeli pa njihovo usedanje in sprijemanje na dno čaše. PVA se je pričel počasi raztopljal šele pri temperaturi nad 80°C, kolikor smo segreli vodno kopel. Po dveh do treh urah, ko so se raztopile vse polimerne granule, smo čašo ohladili in nadomestili količino destilirane vode, ki je pri segrevanju izhlapela. Koncentrirano raztopino polimera smo razdelili v manjše čaše, katerim smo dodali primerne zatehte modelne učinkovine ter v vsako dodali še izračunano količino destilirane vode, tako da smo dobili 8% (m/m) PVA s po 0·10%, 0·50%, 1·01% in 2·04% (m/m) NaIBU. Vsako od teh smo pokrili s parafinskim filmom in pustili mešati 24 ur. Prazna PVA raztopina in tista z najnižjo vrednostjo dodanega NaIBU sta bili popolnoma prozorni, ostale pa motno-belkaste barve (slika 7).



Slika 7: vodne raztopine 8% PVA z dodanimi različnimi masnimi deleži NaIBU, od leve proti desni: 0, 0.5, 1, 3, 5, 7.5 in 10%. Povzeto po (64)

3.2.4 Elektrostatsko sukanje

Z raztopino za sukanje smo previdno napolnili 20 mL plastično brizgo, na katero smo pritrdirili kovinsko iglo premera 0,8 mm in iz nje iztisnili morebitne zračne mehurčke. Napolnjeno brizgo smo vpeli v črpalko in na iglo priključili elektrodo visokonapetostnega generatorja. Zbiralo smo ovili z aluminijasto folijo, jo ozemljili ter postavili 15 cm od konice igle. Na črpalki smo nastavili pretok in vključili generator. Z močno fokusirano lučjo in kontrastnim temnim ozadjem postavljenim za iglo, smo opazovali droben curek, ki se je ustvaril na konici igle. Sprva smo rahlo prilagajali pretok, dokler se ni ustalil. Aparaturo smo nato pustili prižgano, da se je na zbiralu nabrala zadostna količina NV.

3.2.5 Optimizacija procesnih parametrov

V prvi fazi je bilo potrebno določiti optimalne procesne parametre in jih prilagoditi za vsako uporabljenou formulacijo. Pripravljene raztopine PVA in NaIBU smo sukali pri treh različnih napetostih (10 kV, 15k V, 20 kV) in z različnimi pretoki (0,849 mL/h, 0,919 mL/h, 0,990 mL/h). Ostale spremenljivke so ostale konstantne. Z opazovanjem curka smo določili najprimernejšo kombinacijo pretoka in napetosti, s katerimi smo izdelali po pet vzorcev za sproščanje za vsako koncentracijo učinkovine. Optimalne pogoje za sukanje smo potrdili z analizo NV pod vrstičnim elektronskim mikroskopom.

3.2.6 Vrednotenje z elektronskim mikroskopom

Nanovlakna smo pregledovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (ang. scanning electron microscope – SEM) visoke ločljivosti (Zeiss, model SEM Supra 35 VP, Nemčija) in s sekundarnim detektorjem. Iz aluminijastih folij z nanešenimi vlakni, za katere smo predviedvali, da so bila sukana pod ugodnimi pogoji, smo previdno izrezali približno 5 mm

velike kvadrate, ki smo jih prilepili na nosilce mikroskopa. Te smo analizirali s SEM pri pospeševalni napetosti 1 kV in povečavi 20.000 krat. Dobljene posnetke smo obdelali z računalniškim programom Photoshop CC 2015 (Adobe, USA), da smo ocenili povprečen premer vlaken. Na SEM posnetkih smo izbrali 20-30 naključno izbranih segmentov vlaken in jim določili premer glede na merilo mikroskopa. Nabor idealnih pogojev smo nato uporabili za izdelavo serij vzorcev PVA nanovlaken s koncentracijami NaIBU 1, 5, 10 in 20% namenjenih analizi sproščanja učinkovine. Vsakega od teh vzorcev smo sušili 90 minut, da smo dobili uporabno količino.

3.2.7 Poskus stabilizacije

V preteklem raziskovalnem delu Zavaloke, ki je preučevala vgrajevanje in sproščanje natrijevih soli nesteroidnih antirevmatikov iz elektrosukanih PVA nanovlaken, je o sproščanju NaIBU zapisano: »Ugotovili smo, da se, ne gleda na vsebnost vgrajene učinkovine, ta v celoti sprosti takoj po dodatku pufra« (65). Zaradi hitrega sproščanja učinkovine smo poskusili PVA nanovlakna stabilizirati. Odločili smo se za stabilizacijo s toploto. Ploskve aluminijaste folije, na katere smo nasukali vlakna, smo postavili v avtoklav za 30 minut pri 160°C.

3.2.8 Priprava fosfatnega pufra

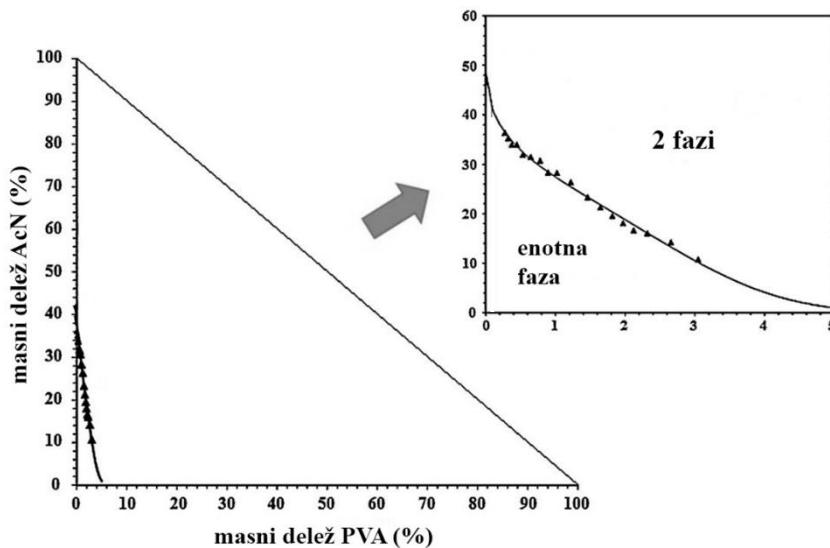
Fosfatni pufer (ang. phosphate-buffered saline, PBS) je pogost medij v bioloških raziskavah. Je izotoničen in netoksičen, zato predstavlja za večino celic ugodno okolje, sicer pa simulira človeško plazmo.

Za pripravo 1 L smo v bučko natehtali 8·0 g NaCl, 0·2 g KCl, 1·44 g Na₂HPO₄, 0·24 g KH₂PO₄ in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Nato smo pripravili 0,1 M raztopini NaOH in HCl ter z njuno pomočjo uravnali pH pufra na 7,4. Tako pripravljen pufer smo v nadaljevanju uporabili za določevanje sproščanja učinkovine iz NV.

3.2.9 Postavitev metode za *in vitro* sproščanje

Metoda za določanje *in vitro* sproščanja naj bi bila razvita s poudarkom na mesto predvidene aplikacije, kot tudi na lastnosti faramcevtske oblike ter uporabljenega zdravila. Zagotoviti mora ponovljive rezultate sproščanj in omogočiti ločevanje med različnimi formulacijskimi ali procesnimi spremenljivkami, ki imajo vpliv na biološko uporabnost (88).

Nanovlakna še niso uveljavljena kot dostavni sistem zdravilnih učinkovin. Dosedanje raziskave in vitro sproščanja na naši fakulteti so pokazale relativno visoka odstopanja rezultatov. Z namenom izboljšanja ponovljivosti smo odstranili PVA iz vzorcev sproščanja. To smo storili s topilom v katerem je PVA netopen, a se prosto meša z vodo in ne vpliva na merjeno koncentracijo NaIBU. Izbrali smo acetonitril (AcN), polarno organsko topilo, ki ga zaradi odličnih spektroskopskih lastnosti uporabljamo kot mobilno fazo pri kromatografiji visoke ločljivosti in podobnih analiznih metodah. V vsak vzorec odvzet pri sproščanju učinkovine smo dodali enakovreden volumen AcN, ga premešali z vorteks stresalnikom, da se je ostanek PVA nanovlaken oboril oz. geliral, katerega smo nato enostavno odstranili. PVA se z acetonitriлом sicer meša in tvori enofazni sistem, vendar zgolj v ozkem koncentracijskem območju (slika 8) (89). V 1 mL 8% vodne raztopine PVA se nahaja približno 86,95 mg PVA. Dodatek 1 mL AcN, katerega masa znaša 786 mg, zniža koncentracijo PVA na 4,64%, masni delež AcN pa na 42%. Da bi nastala ena faza in bi se PVA razapljal, bi morala biti njegova koncentracija nižja od 0,2%.



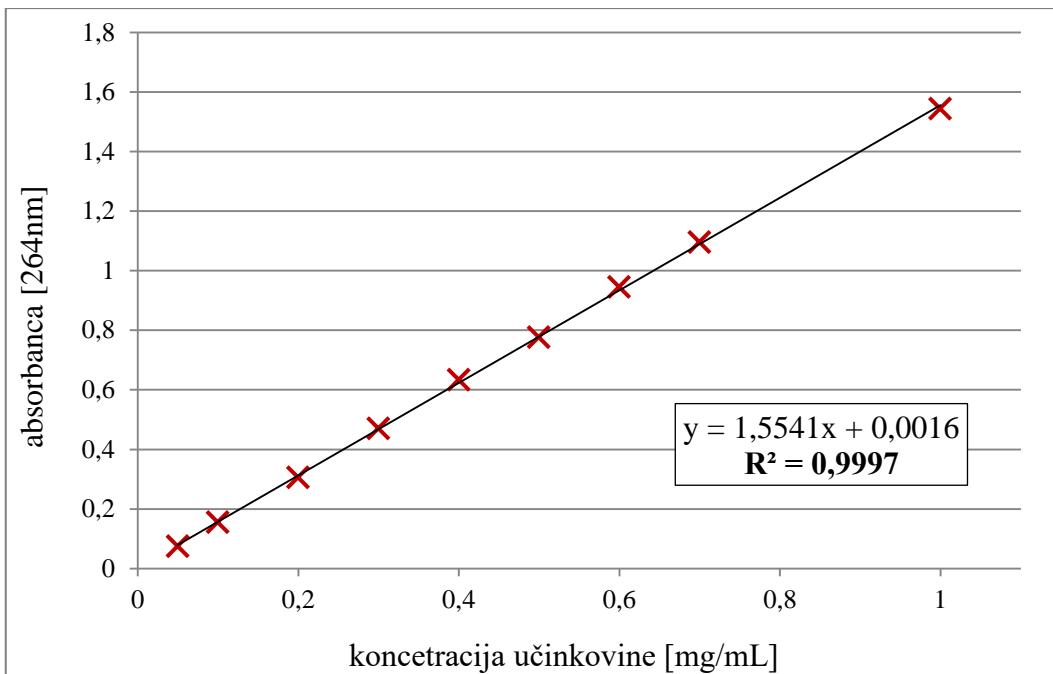
Slika 8: fazni diagram AcN-PVA-voda pri 25°C in atmosferskem tlaku, Mw polimera 85.000-124.000 g/mol, ki prikazuje koncentracijska območja v katerih se komponente med seboj prosto mešajo v enotno fazo in pri katerih nastane dvofazni sistem. Prikejeno po (89)

3.2.9.1 Preverjanje morebitnih interakcij med acetonitrilom in natrijevim ibuprofenatom

Mešanica vode in AcN tvori netopilo za NaIBU (90). Čeprav praktični poizkus dodatka AcN vodni raztopini NaIBU ni pokazal znakov obarjanja, smo vseeno preverili morebitno motenje kvantifikacije NaIBU zaradi dodatka organskega topila in odstranjevanje PVA. Pripravili smo standardne raztopine PVA z različnimi koncentracijami NaIBU raztopljeni v PBS in jim pomerili absorbanco pri izbrani valovni dolžini. Nato smo postopek ponovili še dvakrat, le da smo raztopinam dodali enak volumen AcN in pomešali z vorteks stresalnikom, da je PVA geliral. Slednjega smo v drugi seriji odstranili s filtriranjem skozi 0,45 µm filter, v tretji pa z enostavnnejšim centrifugiranjem pri 4.000 obratih na minuto za 12 minut. Slednje smo na koncu vključili kot del naše *in vitro* metode.

3.2.9.2 Umeritvena premica

Za kvantitativno določanje natrijevega ibuprofena oz. ibuprofenata (anionske oblike učinkovine v raztopini) smo izbrali UV-VIS spektrofotometrijo. Meritev absorpcijskega spektra je pokazala, da moramo zaradi dodatka AcN in obarjanja PVA izbrati drugo, manj ugodno valovno dolžino, pri kateri bomo merili ibuprofenat. Kot posledica niže absorbance merjene učinkovine se je s znižala občutljivost analizne metode (v primerjavi z absorpcijskim maksimumom za približno 200x). Začetno raztopino NaIBU smo pripravili pri koncentraciji 1,00 mg/mL. Natehtali smo 100 mg NaIBU in ga kvantitativno prenesli v 100 mL bučko ter dopolnili do oznake s predhodno pripravljenim fosfatnim pufrom. Osnovno raztopino smo redčili, da smo dobili koncentracije 1·00, 0·70, 0·60, 0·50, 0·40, 0·30, 0·20, 0·10 in 0·050 mg/mL, katerim smo izmerili absorbanco z UV-VIS spektrofotometrom. Pred pričetkom smo posneli še ozadje PBS, brez dodanega NaIBU. Vsako od standardnih koncentracij smo posneli v treh paralelkah. Umeritvena premica je prikazana na sliki 9.



Slika 9: umeritvena premica - natrijev ibuprofenat

Občutljivost analizne metode nam preko meje kvantifikacije (LOQ) določa koncentracijsko območje vzorcev, ki jim lahko zanesljivo določimo vsebnost. Nizki občutljivosti smo morali prilagoditi količino oz. koncentracije vzorcev, ki jih merimo z UV-VIS. Zato smo za posamezno sproščanje namenili celotno vsebino NV na aluminijasti foliji, nastalo po 90 minutah sukanja. Da je bila koncentracija učinkovine čim večja, smo uporabili zgolj 10 mL receptorskega medija in temu primerne epruvete.

3.2.9.3 Tehtanje vzorcev nanovlaken in prenos na nosilec za sproščanje

Čeprav so nanovlakna relativno enostaven ter bolj varen nanomaterial za rokovanje v primerjavi z nanodelci, klasična izdelava z nanašanjem na folijo ali drugo prevodno podlago prinaša težavo odstranjevanja in prenosa v končno dostavno obliko. Pri opravljenih raziskavah na naši fakulteti so uporabili krovna stekelca, na katera so neposredno sukali vzorce NV ali pa so izrezali določeno dimenzijo aluminijaste folije (65,66). To v našem primeru, zaradi potrebe po večjih koncentracijah učinkovine v analitskih vzorcih, ni bila primerna rešitev. Namesto tega smo uporabili celotno vsebino folije, na katero smo sukali NV 90 minut. Ta smo morali prej še prenesti iz folije v obliko, ki bi bila primerna za majhen volumen vsebnika za sproščanje, z realno izpostavljenou površino. Kot primerno rešitev smo izbrali prirezane steklene palčke, dolge približno 15-20 cm. Po predhodnjem tehtanju prazne palčke, smo nanjo previdno prenesli vsebino celotne

površine folije in jo skrbno ovili okoli steklene palčke (slika 10). Iz razlike mas navite in prazne palčke smo dobili maso vlaken, iz katerih smo opazovali sproščanje učinkovine.



Slika 10: vsebina enega vzorca NV prenešena iz aluminijaste folije na stekleno palčko, pripravljena za preizkus *in vitro* sproščanja (vir: J.Dolenc)

Če predpostavljamo, da je masa vzorca NV z 10% NaIBU 100 mg, to teoretično znaša 10 mg učinkovine. Da bomo lahko še vedno zaznali in kvantificirali 5% celotne vsebnosti, znaša volumen medija za sproščanje, glede na umeritveno krivuljo, maksimalno 10,06 mL. Zato smo kot vsebnik za sproščanje izbrali 10 mL plastično epruveto oz. centrifugirko.

Ker je sproščanje NaIBU potekalo dokaj hitro, smo vzorčili pogosteje v prvih nekaj minutah po stiku z medijem. Odvzemali smo po 1 mL z avtomatsko pipeto in vsakič nadomestili odvzeto količino z novim PBS pufrom enakega volumna. Sproščanje je potekalo na mešalni mizici, ki je zagotavljala zmerno stopnjo agitacije.

Kumulativno sproščeno učinkovino smo izračunali po formuli:

$$m_{total} = \sum_t c_{t-1} * V_{vzorec} + c_t * V_{vsebnik}$$

m_{total} : celokupno sproščena učinkovina iz NV

V_{vzorec} : volumen odvzetega vzorca (1 mL)

c_t : koncentracija NaIBU v mediju ob času odvzema t

$V_{vsebnik}$: volumen medija za sproščanje v centrifugirki (10 mL)

3.2.9.4 Popolno sproščanje

Ker je določen delež vlaken vedno ostal neraztopljen na palčki tudi po več dneh in se koncentracija v akceptorskem mediju ni več spreminja od dveh ur naprej, smo za zadnji dve seriji izvedli še t.i. popolno sproščanje. Epruvete s palčko in preostankom NV na njih smo prenesli v vodno kopel ter segrevali do približno 80°C. Pri tem smo pazili, da je izparelo čim manj medija. Ko so se vlakna dokončno raztopila, smo iz vsake epruvete odvzeli vzorce v dveh paralelkah in jih obravnavali enako kot preostale za UV-VIS analizo.

Popolno sproščanje nam je omogočilo, da smo določili delež učinkovine, ki je zaostal v PVA nanovlaknih. Tako smo lahko ocenili pravo vsebnost NaIBU in s tem dejansko učinkovitost vgradnje v vlakna glede na teoretično vrednost, ki naj bi jo ta vsebovala. Učinkovitost vgradnje smo izračunali po naslednji formuli:

$$w_{eff} = \frac{m_{total}}{m_{teor}} = \frac{\sum_t c_{t-1} * V_{vzorec} + c_t * V_{vsebnik} + c_{final} * V_{vsebnik}}{m_{NV} * w\%}$$

w_{eff} : učinkovitost vgradnje NaIBU v NV

m_{total} : celokupna vsebnost NaIBU v NV

m_{teor} : teoretična vsebnost NaIBU v NV

m_{NV} : natehtana masa NV

$w\%$: teoretični delež NaIBU

V_{vzorec} : volumen odvzetega vzorca (1 mL)

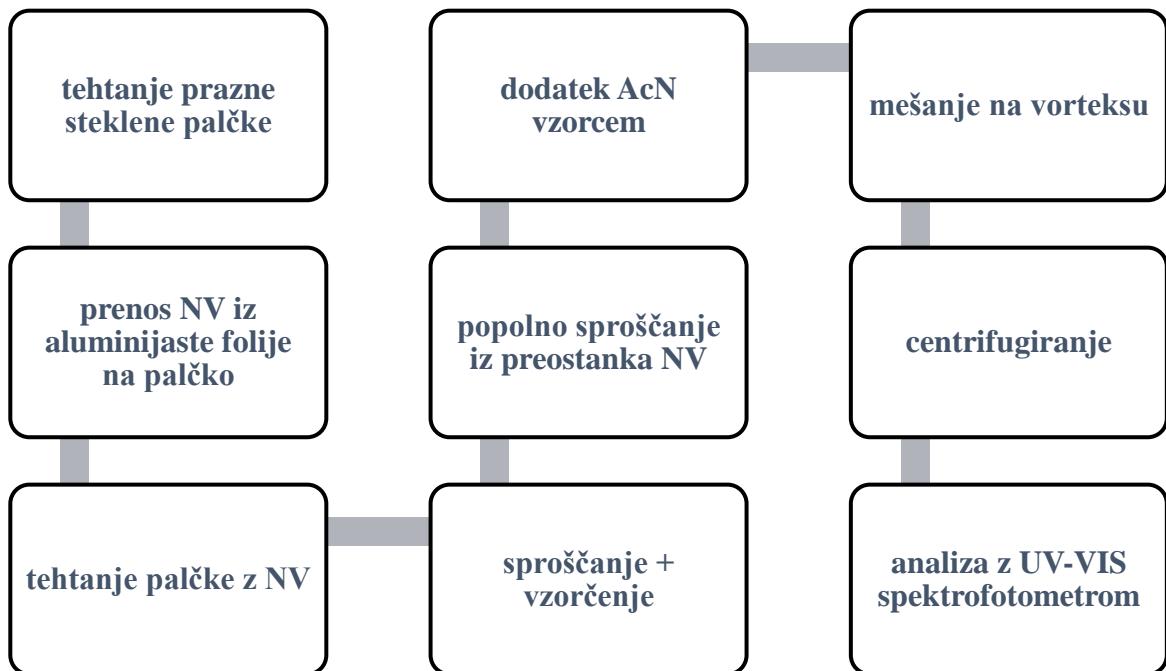
c_t : koncentracija NaIBU ob času odvzema t

$V_{vsebnik}$: volumen medija za sproščanje v centrifugirki (10 mL)

c_{final} : koncentracija NaIBU po totalnem sproščanju

Stabilnost NaIBU pri povišani temperaturi smo potrdili s pripravo raztopine NaIBU, ki smo jo 30 minut segrevali pri 90°C. UV-VIS meritev koncentracije je pokazala enako vrednost pred in po segrevanju. Povzetek metode za *in vitro* sproščanje, kot smo jo postavili tekom naših raziskav, je predstavljena v preglednici II.

Preglednica II: Povzetek metode za *in vitro* sproščanje iz elektrostatsko sukanih PVA nanovlaken z vgrajenim NaIBU



4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA PROCESNIH SPREMENLJIVK

V fazi optimizacije smo opazovali proces sukanja NV iz pripravljenih PVA raztopin z dodanim NaIBU pri različnih pretokih (med 0,849 in 0,990 mL/min) in napetostih (10, 15 in 20 kV). Izmed teh smo določili kombinacije nastavitev, pri katerih je bil proces za dano formulacijo najugodnejši z vidika stabilnosti curka. Ostali procesni parametri so ostali konstantni: premer igle 0,8 mm, oddaljenost slednje do zbirala 15 cm. Pogoje okolja smo sicer merili in beležili, a so ostali nekontrolirani. Za 1% in 5% koncentracijo NaIBU smo določili 15 kV kot najustreznejšo napetost. Pri nižji vrednosti je bil curek neizrazit, na zbiralu pa se je nabirala šibka, na široko razpršena lisa. Ob nastavitvi 20 kV so se v obeh primerih koncentracij pojavile nestabilnosti v smislu večih izvorov curka na kapljici, kar je se odrazilo na zbiralu v treh diskretnih lissah ali pa je namesto enotne lise nastal kolobar. Ne glede na nastavljen pretok je kapljica naraščala in se periodično odcepljala. Nekatere od teh so celo zadele in umazale zbiralo. 10 kV napetosti pri 10% NaIBU je ustvarila šibko liso, ki je bila razpršena po celotni površini zbirala, 20% pri isti napetosti pa ozko liso. Pri srednji in visoki napetosti je bil curek za 10 in 20% lepo viden in relativno stabilen. Pretok je bil včasih previsok, včasih prenizek.

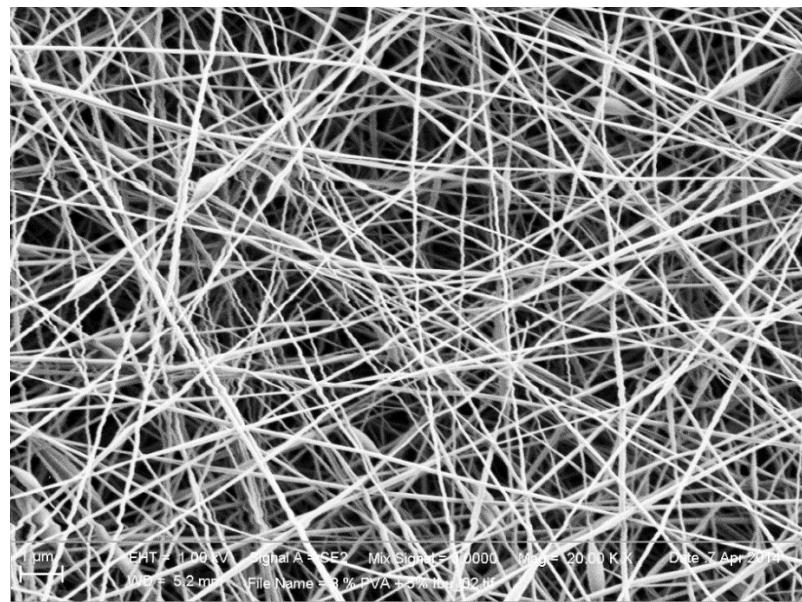
Optimizacija ja pokazala, da so bili predvideni pretoki previsoki. Poleg tega je zaradi elektrostatske narave pretok nestabilen in ga je zato najbolje prilagajati sproti, dokler se ta ne ustali. Različne koncentracije NaIBU so se med seboj razlikovale ne samo po vplivu na proces nastajanja NV, temveč tudi v makroskopski strukturi. Medtem ko so imela prazna PVA vlakna in tista z 1% deležem učinkovine nežno, pajčevinasto strukturo, je bila ta pri ostalih treh koncentracijah učinkovine bolj kompaktna in enotna, naložena v plasteh. Ta je bila enostavnejša za rokovanje in je omogočila skoraj popoln prenos iz folije na nosilec za sproščanje (slika 11).



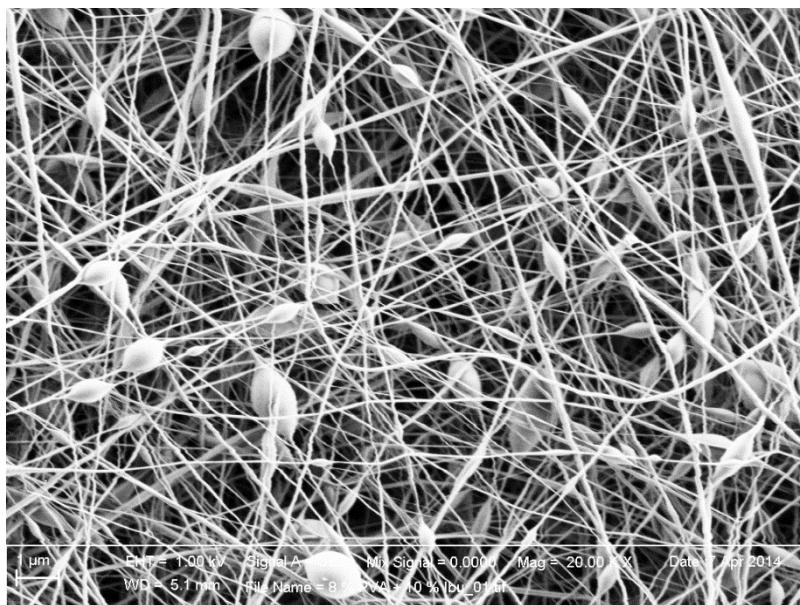
Slika 11: prenos PVA vlaken z 10% NaIBU iz aluminijaste folije na steklene palčko. Z rdečo je označena plastovita struktura nanosa (vir: J.Dolenc)

4.2 ANALIZA POSNETKOV ELEKTRONSKEGA MIKROSKOPA

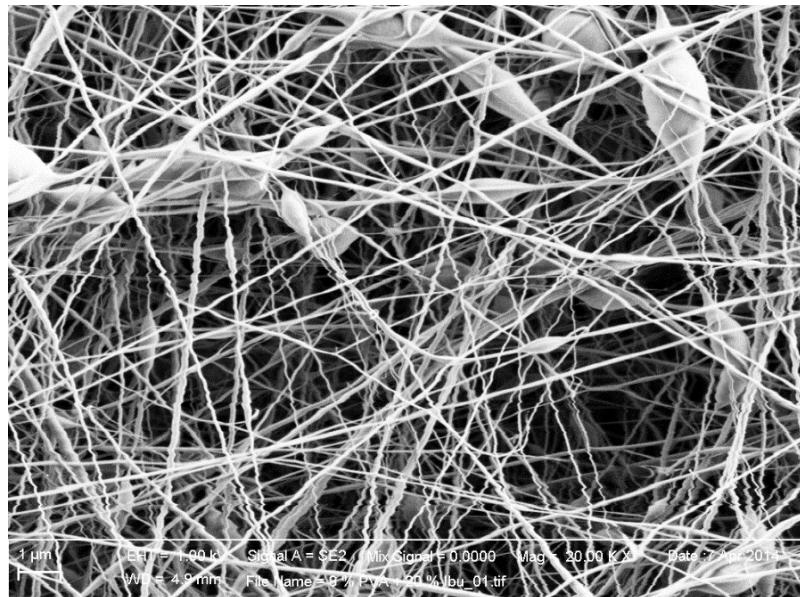
Nastavitev izbrane pri optimizaciji smo uporabili za izdelavo NV, ki smo jih poslali na analizo z elektronskim vrstičnim mikroskopom. Rezultati so prikazani na slikah 12,13,14.



Slika 12: 8% PVA nanovlakna s 5% NaIBU



Slika 13: 8% PVA nanovlakna z 10% NaIBU



Slika 14: 8% PVA nanovlakna z 20% NaIBU

Na podlagi SEM posnetkov in uporabi računalniškega programa Photoshop CC 2015 smo določili povprečen premer NV. Rezultati so prikazani v preglednici III. Vrednosti za 5% NaIBU se dokaj dobro ujemajo z rezultati v delu Zavaloke (65) ($119 \text{ nm} \pm 22 \text{ nm}$), medtem ko so pri ostalih koncentracijah rezultat motili vozli.

Preglednica III: premer NV določen na podlagi SEM posnetkov (*prisotnost vozlov)

NaIBU (%)	Povprečen premer vlaken (nm)
1%	(nismo merili)
5%	99 ± 30
10%	167 ± 202 *
20%	211 ± 267 *

4.3 TOPLITNA STABILIZACIJA NANOVLAKEN

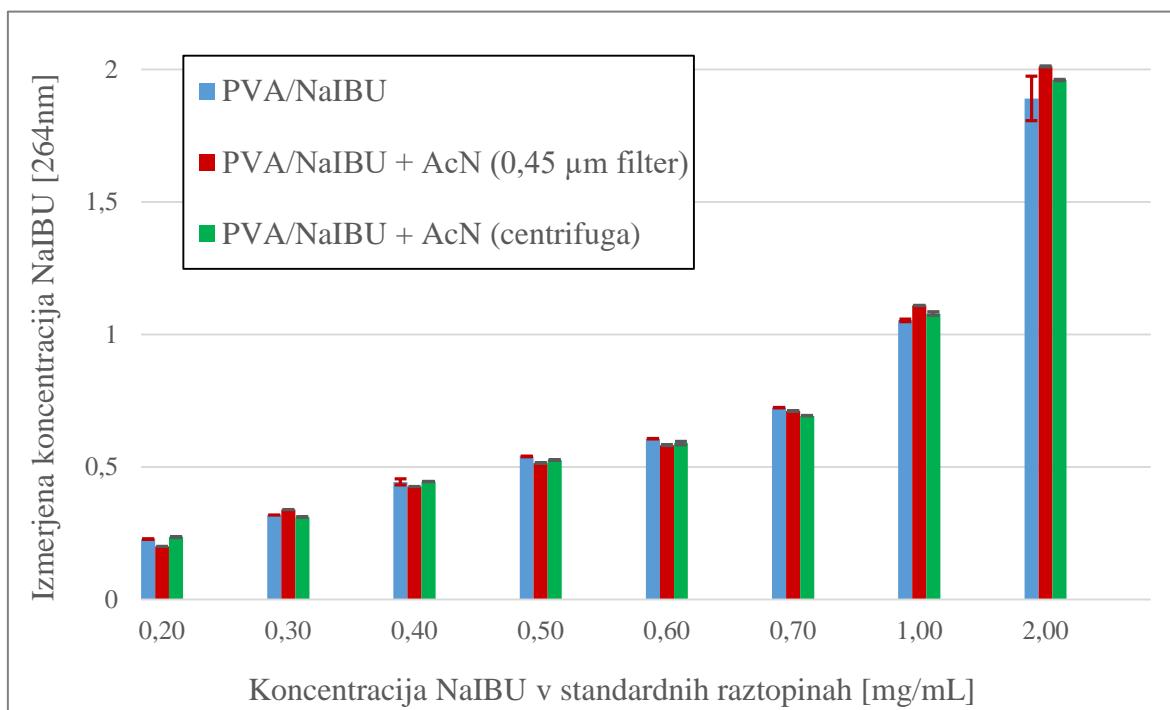
Čeprav je bila stabilizacija PVA nanovlaken z vsebujočim NaIBU v avtoklavu že uporabljena kot strategija za izboljšanje odpornosti proti raztpljanju v vodnem mediju, pretekli raziskovalci niso poročali o nobenih posebnostih ali spremembah (65). V našem primeru so NV, ki so bila izpostavljena visoki temperaturi, rahlo porumenela. SEM analiza ni razkrila nobenih opaznih razlik v primerjavi s strukturo nestabiliziranih vrst. Ob poskusu prenosa z aluminijaste folije na stekleno palčko pa se je izkazalo, da so NV pri segrevanju izgubila takorekoč vso elastičnost, zaradi česar je bilo navijanje težavno. Ob stiku z medijem za sproščanje stabilizirana vlakna niso nabrekala in rumenkasto-rjav odtenek je postal izrazitejši (slika 15). Preizkus sproščanja prav tako ni pokazal nobene prednosti v smislu podaljšanja sproščanja učinkovine v primerjavi z NV, ki niso bila izpostavljena povisani temperaturi. Za končno analizo iz NV smo zato uporabili nestabilizirana NV.



Slika 15: stekleni palčki s preostankom NV po testu *in vitro* sproščanja. Zgoraj vlakna stabilizirana s toploto, spodaj nestabilizirana vlakna (vir: J.Dolenc)

4.4 INTERAKCIJE ACETONITRILA Z NATRIJEVIM IBUPROFENATOM

Za potrditev pravilnosti analiznega postopka z odstranitvijo PVA, smo preverili interakcije organskega topila in morebiten vpliv na meritev vsebnosti učinkovine. Slika 16 prikazuje ujemanje UV-VIS meritev koncentracij NaIBU z dejansko vsebnostjo v pripravljenih standardnih raztopinah z dodanim PVA. Tem smo dodali PVA brez in z dodanim AcN, s tistimi, ki smo jim dodali AcN in odstranili geliran PVA.



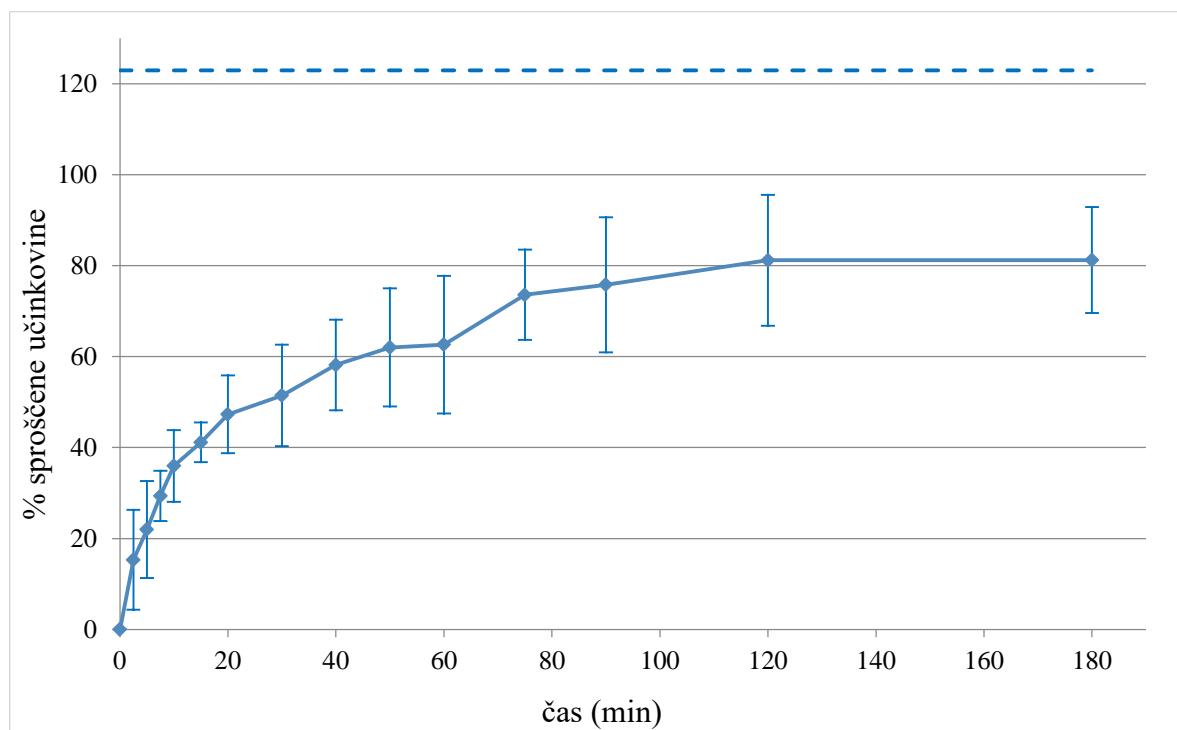
Slika 16: standardne raztopine NaIBU z dodanim PVA (modra), PVA in AcN ter odstranjениm polimerom z filtracijo (rdeča) oz. s pomočjo centrifugiranja (zelena)

4.5 REZULTATI SPROŠČANJA

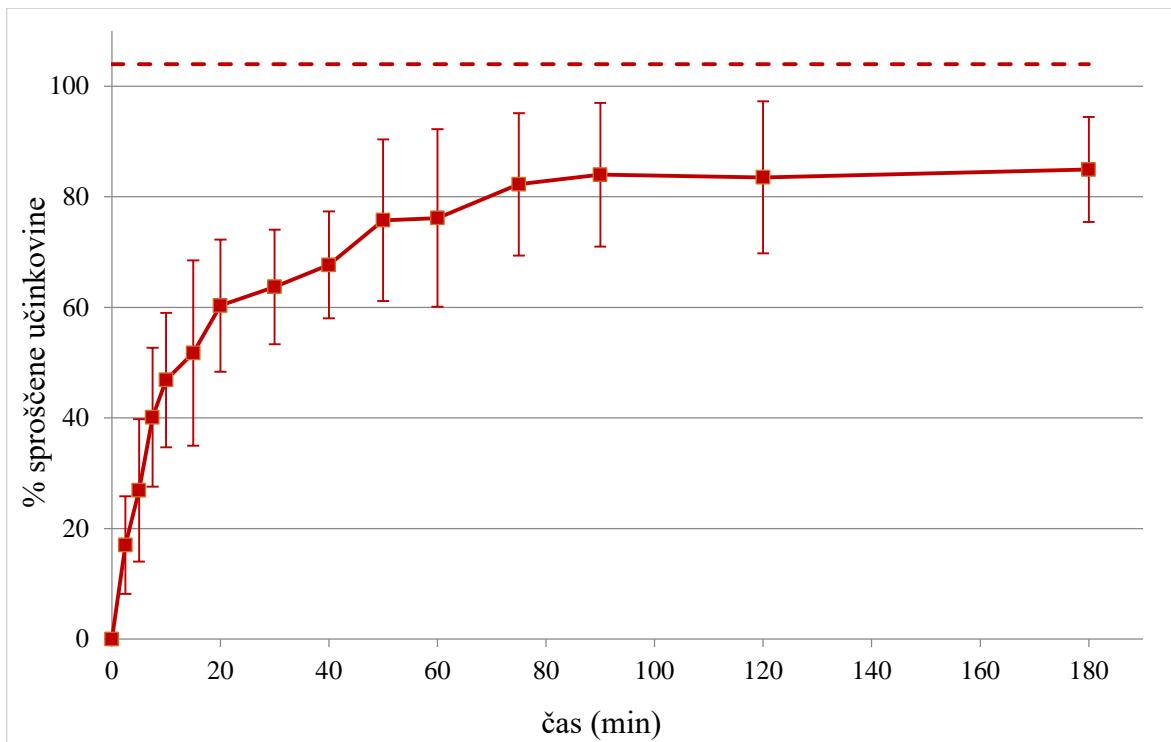
V nadaljevanju so predstavljeni rezultati *in vitro* sproščanja NaIBU iz elektrostatsko sukanih PVA nanovlaken, izvedenega po zastavljeni metodi. Merilo za % sproščene učinkovine se nanaša na teoretično vsebnost, tj. količino, ki naj bi jo vlakna vsebovala glede na koncentracijo v raztopini iz katere so bila ta izdelana. Primer: za vzorec, ki je bil pripravljen iz raztopine z 1,01% NaIBU, naj bi ta v obliki suhih NV vseboval 10% učinkovine. Maso NV smo določili pri 100 mg, torej naj bi vzorec za sproščanje teoretično

vseboval skupaj 10 mg NaIBU. Za omenjeni vzorec je 10 mg predstavljalo 100% sproščene učinkovine.

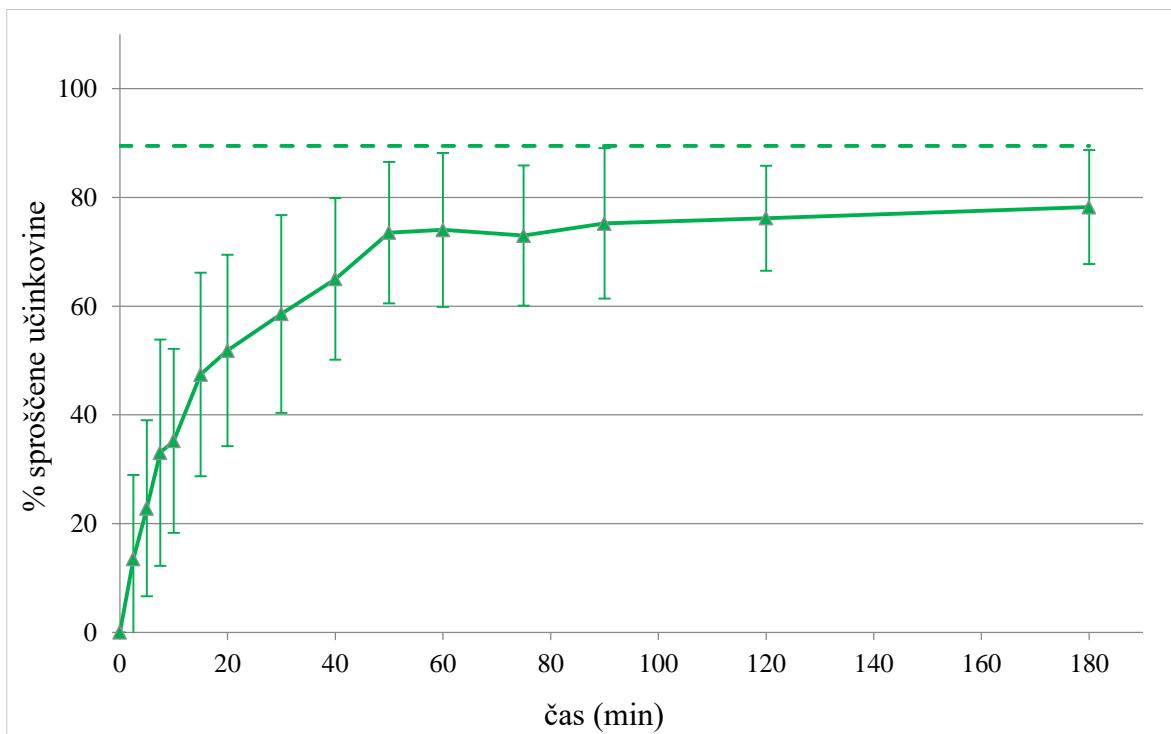
Na slikah 17,18,19 in 20 so prikazani rezultati *in vitro* sproščanja iz PVA nanovlaken z 1, 5, 10 in 20% NaIBU. Za vsako koncentracijo smo izvedli 5 serij sproščanj. Primerjava krivulj je prikazana na sliki 21. Vsakemu grafu je dodana črtkana črta, ki predstavlja zgornjo mejo, izračunano na podlagi popolnega sproščanja za dano koncentracijo in predstavlja 'pravo' vsebnost učinkovine. Če smo za vlakna z 10% NaIBU določili učinkovitost inkapsuliranja 90%, to pomeni da so NV iz zgornjega primera v resnici vsebovala zgolj 9 mg učinkovine namesto 10. Razdalja med krivuljo kumulativno sproščene učinkovine in zgornjo mejo črtkane črte kaže delež zaostalega NaIBU v NV. Razlika med 100% teoretične in zgornjo mejo 'prave' vsebnosti je učinkovitost inkapsuliranja.



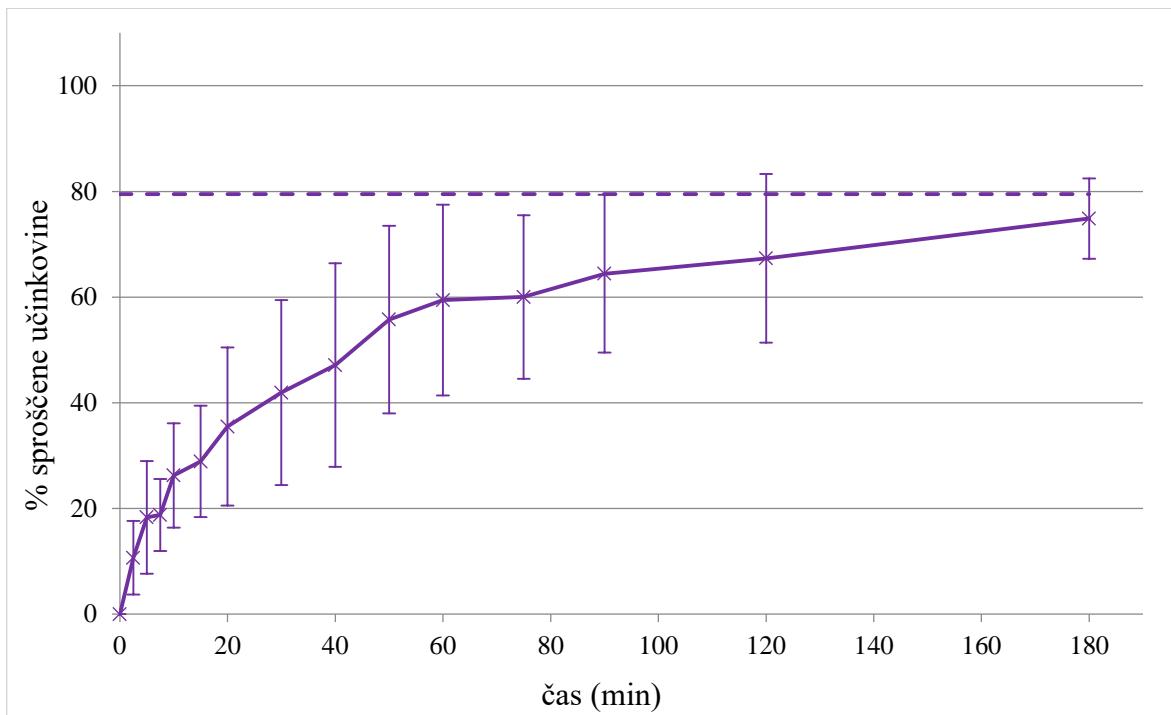
Slika 17: povprečje sproščanja iz PVA NV z **1% NaIBU**, s prikazanimi standardnimi deviacijami in 'pravo' vsebnostjo učinkovine (črtkana črta)



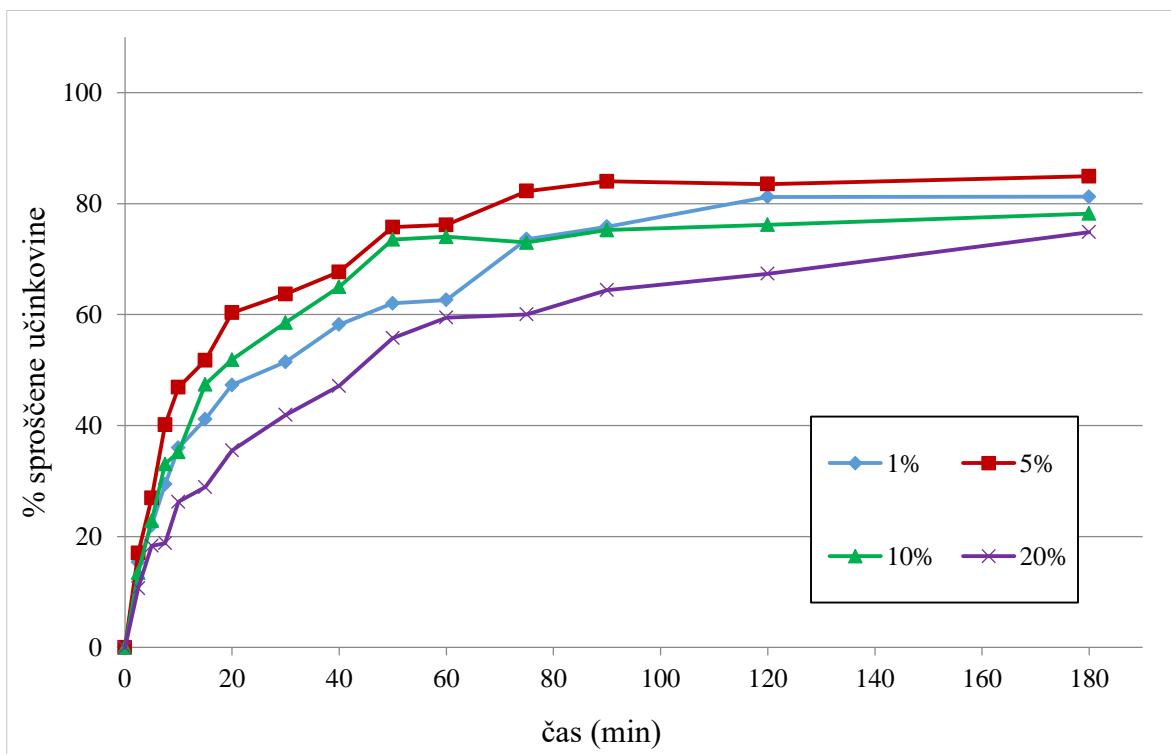
Slika 18: povprečje sproščanja iz PVA NV s **5%** NaIBU, s prikazanimi standardnimi deviacijami in 'pravo' vsebnostjo učinkovine (črtkana črta)



Slika 19: povprečje sproščanja iz PVA NV z **10%** NaIBU, s prikazanimi standardnimi deviacijami in 'pravo' vsebnostjo učinkovine (črtkana črta)



Slika 20: povprečje sproščanja iz PVA NV z **20%** NaIBU, s prikazanimi standardnimi deviacijami in 'pravo' vsebnostjo učinkovine (črtkana črta)



Slika 21: primerjava profilov sproščanj iz PVA NV z različnimi vsebnostmi NaIBU

4.6 POPOLNO SPROŠČANJE UČINKOVINE IN VARIABILNOST MASE

V preglednici IV so predstavljeni rezultati popolnega sproščanja, ki kažejo učinkovitost ter pravilnost inkapsuliranja učinkovine v NV. Prav tako so dodane meritve mas vzorcev NV za sproščanje.

Preglednica IV: popolno sproščanje NaIBU in povprečna masa vzorcev NV za sproščanje

NaIBU (%)	Povprečna učinkovitost vgradnje NaIBU v NV (%)	Povprečna masa vzorcev za sproščanje (mg)
1%	$123 \pm 3,7$	$84,9 \pm 11$
5%	$104 \pm 7,8$	$58,2 \pm 5,3$
10%	$90 \pm 2,3$	$78,1 \pm 9,6$
20%	$80 \pm 0,7$	$93,3 \pm 23$

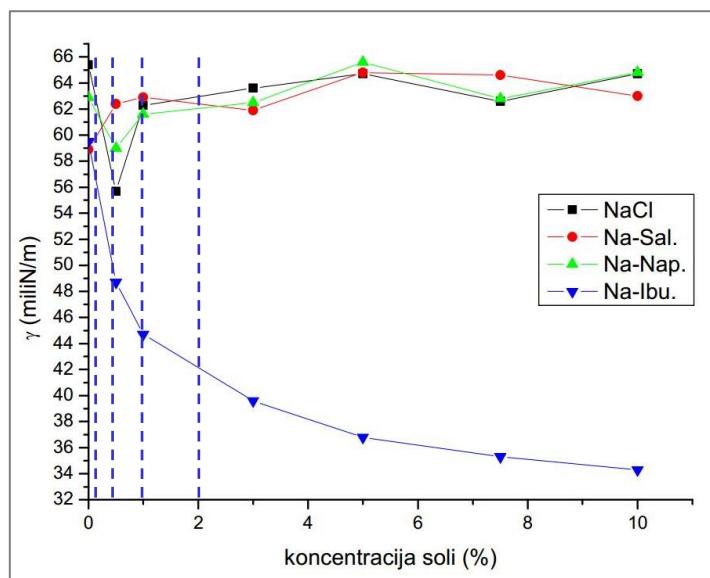
5 RAZPRAVA

Elektrostatsko sukanje je kompleksen proces s številnimi možnimi vzroki variacij. Pri celotni izvedbi od priprave raztopin, izdelave NV in vzorcev za sproščanje, do same izvedbe analize *in vitro* vrednotenja, je bilo možnih mnogo vzrokov tako za sistematicne kot naključne napake.

Elektrostatsko sukanje smo izvajali brez uporabe komore. Zračna vlažnost se je spremenjala naključno skupaj s trenutnimi vremenskimi razmerami, od 34% pa vse do 70%, kar je gotovo prispevalo k razpršenosti končnih rezultatov sproščanja. Pelipenko s sodelavci, ki je preučeval vpliv nasičenosti zraka z vodno paro na tvorbo elektrosukanih PVA nanovlaken, je zaključil: »V primeru PVA nanovlaken lahko premeri znašajo od 161 ± 42 nm (60% vlažnost) do 667 ± 83 nm (4% vlažnost). Vozli na NV so se pojavili ob izvajanju ES pri najvišjih RH (70% vlažnost)« (44). Glede na te izsledke bi lahko sklepali, da so se premeri NV, ki smo jih pripravili iz enakih raztopin in z enakimi deleži NaIBU, med seboj bistveno razlikovali zgolj zaradi nekontroliranja zračne vlažnosti kot procesne spremenljivke. SEM analiza je bila namreč opravljena zgolj za en nabor vzorcev, pripravljen pri eni vrednosti zračne vlage. S tem je prav tako vprašljiva morebitna prisotnost vozov v vzorcih NV za sproščanje.

Posnetki elektronskega mikroskopa so pokazali precejšnje razlike med posameznimi formulacijami in potrdile vpliv vsebnosti učinkovine na končno strukturo nanoogrodja. V nasprotju z ocenami na podlagi podatkov iz literature, se je pojavnost vozov povečevala skupaj s koncentracijo NaIBU. Zupančič je preučevala vpliv različnih natrijevih soli zdravilnih učinkovin na fizikalno kemijske lastnosti 8% vodnih raztopin PVA, med drugim tudi NaIBU, v koncentracijskem območju od 0,5 do 10%. Opravila je meritve gostote, električne prevodnosti, površinske napetosti, reološke lastnosti, ozkokotno sisanje rentgenskih žarkov (SAXS), viskoznosti ter viskoelastičnih lastnosti. Meritve so pokazale, da dodatek NaIBU znatno poveča prevodnost, a vseeno manj kot NaCl. Hkrati s prevodnostjo sta se z dodatkom soli povečala gostota in viskoznost. Pomembno za ES, površinska napetost je z naraščajočo koncentracijo NaIBU padala (slika 22) in je pri koncentraciji 10% znašala skoraj polovico čiste PVA raztopine. Ibuprofenat torej deluje kot površinsko aktivna snov. Razmerje med elastičnim in plastičnim modulom je ostalo nizko skozi obravnavano koncentracijsko območje, v korist slednjega. Meritev SAXS ni

razkrila nobene spremembe strukture PVA molekul zaradi dodatka učinkovine. Iz teh podatkov je moč sklepati, da dodatek NaIBU ne bo negativno vplival na sposobnost PVA raztopine za tvorbo gladkih NV. Kot je zaključila avtorica: »dodatek posameznih soli ne spremeni notranje strukture [vodnih] PVA raztopin, zato predvidevamo, da bi izdelava takšnih NV bila uspešna, ES pa bi lahko izvajali pri istih procesnih pogojih kot jih uporabljamo pri čisti vodni raztopini PVA« (64). Nasprotujoč rezultat je dobila Zavaloka, ki je izdelala nanovlakna iz 8% PVA z deleži NaIBU od 1 do 20% glede na maso suhih vlaken. Pri 1 in 5% so bila ta gladka in brez napak, a pri 10% in 20% so se pojavili vozli (65). Slednje se ujema z našimi lastnimi rezultati.



Slika 22: površinska napetost 8% raztopine PVA v odvisnosti od koncentracije natrijevih soli pri 26°C, kjer črtkane črte označujejo koncentracije NaIBU, iz katerih smo sukali NV vzorce v naši raziskavi: 0·10, 0·50, 1·01 in 2·04% (prirejeno po 64)

Čeprav smo uporabili štiri različne raztopine za izdelavo NV z deleži NaIBU od 1% do 20%, smo v vseh primerih uporabili enak delež PVA, kljub temu, da je učinkovina bistveno spremenila sposobnost sukanja. Glede na teoretično izhodišče je bil pojav vozlov nepričakovani in je prispeval k večji razpršenosti rezultatov, kot je to razvidno iz primerjave grafov za 1 in 5% NaIBU z tistima za 10 in 20%. S tega stališča je presenetljivo, da se oblike krivulj sproščanj iz NV s 5% (brez vozlov) in 10% (z vozli) med seboj ne razlikujeta. Nekoliko bolj postopno je bilo sproščanje iz NV z 20% NaIBU, ki so

tudi vsebovala vozle. Pri teh NV se je polovica učinkovine, ki je bila na voljo za sprostitev, izločila po približno 20 minutah, pri 5% in 10% pa po približno 11 oz. 13 minutah.

Možen vzrok za nastanek vozlov bi lahko bil v nepopolnem raztapljanju učinkovine. Pri 5, 10 in 20% oz. 0'50, 1'01 in 2'04%, kolikor je bil dejanski masni procent NaIBU v raztopinah pri sukanju, se je pojavila belkasta motnost. Vozli se pri 5% sicer niso pojavili. Za omenjene tri koncentracije lahko torej rečemo, da je PVA vplival na topnost učinkovine in so bile zato sukane iz suspenzije namesto raztopine.

Za odstranitev PVA iz medija za sproščanje z AcN smo dokazali, da ni vplival na vrednost absorbance NaIBU, čeprav so dodatni koraki v postopsku verjetno prispevali k dodatnim naključnim napakam.

Čeprav se je učinkovina iz NV sproščala hitro pri vseh jakostih, ne moremo govoriti o pojavu učinka izbruha. Krivulje za vse jakosti so skladne in kažejo na relativno stabilno, sigmoidno približevanje konstantni vrednosti. To gre pripisati dobri vodotopnosti učinkovine, kot tudi kompatibilnosti obeh komponent NV. Kljub večjemu naboju in mobilnosti manjše molekule NaIBU napram PVA, se tekom elektrosukanja učinkovina ni koncentrirala na površini ali agregirala v obliki kristalov, kot je razvidno iz SEM posnetkov. Sklepamo, da je pri hidrofilnem polimeru in zelo dobro vodotopni učinkovini, kompaktnost zgradbe manj pomembna, saj se učinkovina sprošča z difuzijo ob nabrekanju polimera in prodiranju vode v notranjost. S tega vidika sistematična napaka zaradi ročnega navijanja NV iz aluminijaste folije na stekleni nosilec ni imela bistvenega pomena. Vpliv strukture polimera na sproščanje zdravilne učinkovine je pri PVA nanovlaknih sicer zapleten, vendar zaenkrat ni poglobljenih raziskav na molekularnem nivoju (33).

Popolno sproščanje je pokazalo razlike med teoretično vsebnostjo učinkovine, kolikor naj bi je NV vsebovala glede na pripravljene raztopine za sukanje, ter dejansko celokupno količino, kolikor smo izmerili tekom celotnega sproščanja, vključno z neraztopljenimi vlakni in v njih zaostalim NaIBU. Učinkovitost inkapsuliranja je padala z naraščajočim deležem učinkovine v NV. V primeru 1% NaIBU je vgradnja celo presegla 100%, torej se jem glede na dobljene rezultate, v vlakna koncentriralo več učinkovine, kot jo je bilo prisotne v sami raztopini iz katere smo vlakna izdelali. Na drugi strani se je v vlakna sukana iz 10% NaIBU vgradilo le 90%, iz 20% raztopine celo zgolj 80% učinkovine. Pri 5% NaIBU je bila učinkovitost vgradnje približno enaka 100%. Vzrok za takšne razlike je neznan. Prav tako je bilo sproščanje iz ogrodij z večjim deležem NaIBU popolnejše kot pri

tistih z nižjimi, kjer je več učinkovine ostalo ujete v vlaknih. Pri 1% formulaciji je ob koncu sproščanja v vlaknih ostala tretjina vsebovanega NaIBU. Pri 5% se je izločilo 82% učinkovine, v primeru 10% in 20% pa se je sprostila skoraj vsa (97%). NaIBU očitno moti prepletanje PVA verig in s tem lastno vgradnjo v polimer.

Potrebno je omeniti, da so rezultati UV-VIS meritev za vlakna z 1% NaIBU nezanesljivi. Večina vrednosti dobljenih pri sproščanju za ta NV so bila, glede na umeritveno premico, pod mejo kvantifikacije (1,00 – 0,05 mg/mL).

V preteklih raziskovalnih nalogah so sproščanje modelne učinkovine opazovali iz zgolj nekajcentrimetrskih kvadratnih koščkov PVA novlaken, ki so v vodi hipno razpadli. V našem primeru smo uporabili znatno večje količine NV. Posledica je bila drugačna kinetika sproščanja učinkovine in obnašanje PVA ob stiku z medijem; na palčki se je raztopil oz. je razpadel zgolj zunanji del, medtem ko je notranjost nabrekala. Čeprav ne pride do kristalizacije, se tekom nastajanja NV molekule PVA najverjenteje med seboj dovolj dobro orientirati, da se lahko upirajo raztopljanju v vodi.

Za neuspeli poskus stabilizacije lahko na podlagi rezultatov predvidevamo, da je pri segrevanju prišlo do kemijske reakcije med učinkovino in polimerom. Esterifikacija med prostimi –OH skupinami na PVA in karboksilno kislino ibuprofenata je teoretično sicer mogoča glede na povišano temperaturo, vendar manjka prisotnost močne kisline, ki bi služila kot katalizator. Poleg tega esterifikacija ne razloži razpada polimerne verige, ki je vzrok za izgubo viskoelastičnosti stabiliziranih vlaken. Najverjetnejše je reakcija bolj kompleksna in je potekala na ravni oksidacije. Sam PVA naj bi bil termostabilen do temperature 180°C (39). Za potrditev bi bile potrebne dodatne raziskave (npr. IR spektroskopija). Za podaljšanje sproščanja NaIBU iz PVA vlaken bi bilo potrebno raziskati alternativne možnosti formulacij, ali morda bolje, izdelati NV tipa jedro-obloga.

6 SKLEP

Namen našega dela je bila postavitev metode za *in vitro* sproščanje modelne učinkovine iz PVA nanovlaken. Razvoj je zahteval dobro poznavanje parametrov procesa ES in njihovega odnosa do končne morfologije ter lastnosti NV.

Za ta namen smo izbrali kombinacijo modelne učinkovine s polimerom in preučili njune lastnosti, na podlagi katerih smo potem prilagodili spremenljivke procesa ES in izdelali NV za sproščanje. Z elektronskim mikroskopom smo potrdili nastanek vlaken v nanometrskem območju in opazovali vpliv učinkovine na morfologijo NV. Pri 5% NaIBU glede na suho maso vlaken je bil premer $99\text{ nm} \pm 30\text{ nm}$, pri 10 in 20% pa $167\text{ nm} \pm 202\text{ nm}$ in $211\text{ nm} \pm 267\text{ nm}$ (za 1% premera nismo določali). Pri najvišjih dveh koncentracijah so bili premeri izjemno neenakomerni zaradi pojava vozlov. Kot poskus izboljšanja ponovljivosti smo se odločili v naši metodi pred analizo izločiti nosilni polimer. Posledično smo za UV-VIS določitev modelne učinkovine izbrali manj ugodno valovno dolžino. Omejitvam območja kvantifikacije smo prilagodili postopek *in vitro* sproščanja v smislu mase testiranih vlaken in uporabljenega volumna medija, kot tudi samo pripravo vzorcev za analizo. Z izvedbo popolnega sproščanja smo lahko določili učinkovitosti vgradnje učinkovine.

Na podlagi obravnavanih rezultatov lahko predlagamo nekatere izboljšave, ki bi pripomogle k večji kakovosti NV in s tem boljši ponovljivosti:

- Uporaba komore, s katero bi lahko natančno nadzorovali relativno vlažnost in temperaturo.
- Avtomatizacija procesa s sposobnostjo dinamičnega prilagajanja pretoka in napetosti za ohranjanje Taylorjevega stožca znotraj idealnih okvirjev tekom celotnega poteka sukanja NV.
- Avtomatizacija analitike, ki bi odpravila naključne napake ročnega vzorčenja.
- Natančna prilagoditev procesnih spremenljivk za vsako kombinacijo polimer- učinkovina glede na sposobnost sukanja (na primer, višja koncentracija polimera za višje koncentracije učinkovin).
- Konstantno mešanje raztopine v brizgi tekom ES za boljšo homogenost in enakomernejšo razporeditev majhnih molekul v polimernem ogrodju NV.

- Enostavnejši prenos vlaken iz zbirala na nosilec, npr. z neposrednim sukanjem na končno dostavno obliko.
- uporaba HPLC kolone za višjo občutljivost analizne metode.

Poleg analize rezultatov sproščanj, smo skupaj z obravnavanjem vseh meritev in variacij dobili boljši vpogled ter razumevanje procesa sukanja polimernih vlaken v električnem polju.

7 LITERATURA

1. S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, Z. Ma: An introduction to electrospinning and nanofibers. World Scientific Publishing 2005, strani: 3, 15-18, 42, 81-117, 132
2. G. Panthi, M. Park, H.-Y. Kim, S.-J. Park: Electrospun polymeric nanofibers encapsulated with nanostructured materials and their applications: A review. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 2015, 24: 1–13
3. T.H. Grafe, K.M. Graham: Nanofiber webs from electrospinning. Nonwovens in Filtration Conference, 2003
4. H.Y. Chung, Book Review: »Electrospinning of Micro- and Nanofibers: Fundamentals in Separation and Filtration Processes«. Journal of Engineered Fibers and Fabrics 2008, 3: 36-37
5. J. Doshi, D.H. Reneker: Electrospinning process and applications of electrospun fibers. Journal of Electrostatics 1995, 35: 151-160
6. J. Lannutti, D Reneker, T. Ma, D. Tomasko, D. Farson: Electrospinning for tissue engineering scaffolds. Materials Science and Engineering C 2007, 27: 504-509l
7. N. Bhardwaj, S.C. Kundu: Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Biotechnology Advances 2010, 28: 325–347
8. J. Pelipenko, P. Kocbek, J. Kristl: Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. International Journal of Pharmaceutics 2015, 484: 57-74
9. T.J. Sill, H.A. von Recum: Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials 2008, 29: 1989-2006
10. D.H. Reneker, A.L. Yarin: Electrospinning jets and polymer nanofibers. Polymer 2008, 49: 2387-2425
11. Y. Zhang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Z.-M. Huang: Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. Journal of Material Science: Materials in Medicine 2005, 16: 933-946
12. V. Bertoncelj, J. Pelipenko, J. Kristl, M. Jeras, M. Cukjati, P. Kocbek: Development and bioevaluation of nanofibers with blood-derived growth factors for dermal wound healing. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2014, 88: 64-74
13. Zupančič, Š., Baumgartner, S., Lavrič, Z., Petelin, M., Kristl, J. Local delivery of resveratrol using polycaprolactone nanofibers for treatment of periodontal disease. Journal of Drug Delivery Science and Technology 2015, 30: 408-416

14. T. Potrč, S. Baumgartner, R. Roškar, O. Planinšek, Z. Lavrič, J. Kristl, P. Kocbek: Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 75: 101-113
15. N.M. Thoppey, J.R. Bochinski, L.I. Clarke, R.E. Gorga: Unconfined fluid electrospun into high quality nanofibers from a plate edge. Polymer 2010, 51: 4928-4936
16. R. Sahay, V. Thavasi, S. Ramakrishna: Design modifications in electrospinning setup for advanced application. Journal of Nanomaterials 2011: 1-17
17. M. Ziabari, V. Mottaghitalab, A.K. Haghi: Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter. Brazilian Journal of Chemical Engineering 2009, 26: 53-62
18. S. L. Shenoy, W.D. Bates, H.L. Frisch, G.E. Wnek: Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit. Polymer 2005, 46: 3372–3384
19. Y. Xin, D.H. Reneker: Garland formation process in electrospinning. Polymer 2012, 53: 3629-3635
20. M.M. Hohman, M. Shin, G. Rutledge, M.P. Brenner: Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability Theory. Physics of fluids 2001, 13: 2201-2220
21. D.H. Reneker, W. Kataphinan, A. Theron, E. Zussman, A.L. Yarin: Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning. Polymer 2002, 43: 6785-6794
22. B. Chu, B.S. Hsiao, D. Fang: Apparatus and methods for electrospinning polymeric fibers and membranes. US Patent No.: US 6713011 B2
23. G.H. Kim, Y.-S. Cho, W. D. Kim: Stability analysis for multi-jets electrospinning process modified with a cylindrical electrode. European Polymer Journal 2006, 42: 2031–203
24. P. Vrbata, P. Berka, D. Stránska, P. Doležal, M. Musilová: Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. International Journal of Pharmaceutics 2013, 457: 168–176
25. A L. Yarin, E. Zussman: Upward needleless electrospinning of multiple nanofibers. Polymer 2004, 45: 2977–2980
26. J.S. Varabhas, G.G. Chase, D.H. Reneker: Electrospun nanofibers from a porous hollow tube. Polymer 2008, 49: 4226–4229
27. G.Jiang, X. Qin: An improved free surface electrospinning for high throughput manufacturing of core-shell nanofibers. Materials Letters 2014, 128: 259–262
28. Š. Zupančič, Sinha-Ray, S., Sinha-Ray, S., J. Kristl, A.L. Yarin: Controlled Release of Ciprofloxacin from core-shell nanofibers with monolithic or blended core. Molecular Pharmaceutics 2016, 13: 1393-1404

29. A. Koski, K. Yim, S. Shivkumar: Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. Materials Letters 2004, 58: 493–497
30. C.J. Thompson, G.G. Chase, A.L. Yarin, D.H. Reneker: Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. Polymer 2007, 48: 6913-6922
31. J. Tao: Effects of molecular weight and solution concentration on electrospinning of PVA. Worcester Polytechnic Institute, Združene države Amerike 2003, diplomska naloga
32. C. Thang, X. Yuan, L. Wu, Y. Han, J. Sheng: Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. European Polymer Journal 2005, 41: 423–432
33. S. Baumgartner, U. Mikac, A. Sepe, P. Kocbek, M. Bešter-Rogač, R. Rošić, J. Pelipenko, J. Kristl: Investigation of polymer molecular structure enables understanding of dosage form drug delviery. 5th BBBB International Confernece, Portorož 26-28 Semptember 2013
34. V. Gordon, G. Marom, S. Magdassi: Formation of hydrophilic nanofibersfrom nanoemulsions through electrospinning. International Journal of Pharmaceutics 2015, 478: 172–179
35. A.F. Spivak, Y.A. Dzenis, D.H. Reneker: A model of steady state jet in the electrospinning process. Mechanical Research Communications 2000, 27: 37-42
36. R. Rošić, J. Pelipenko, P. Kocbek, S. Baumgartner, M. Bešter-Rogač, J. Kristl: The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrosppining. Eureaoan Polymer Journal 2012, 48: 1374-1384
37. J.L. Manasco, C.D. Saquing, C.T. Tang, S.A. Khan: Cyclodextrin fibers via polymer-free electrospinning. RSC Advances 2012, 2: 3778–3784
38. J.L. Manasco, C. Tang, N.A. Burns, C.D. Saquing, S.A Khan: Rapidly dissovling poly(vinyl alcohol)/cyclodextrin electrospun nanofibrous membranes. Royal Society of Chemistry 2014, 4: 13274-13279
39. Clariant GmbH, Mowiol Polyvinal Alcohol, december 1999
40. J. Tao, S. Shivkumar: Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA. Materials Letters 2007, 61: 2325–2328
41. N. Kizildag, Y. Beceren, M. Kazanci, D. Cukul: Effect of needle diameter on diameter of electrospun silk fibroin nanofibers. 4th RMUTP International Conference: Textiles and Fashion, Tajska 2012
42. J. Pelipenko, P. Kocbek, B. Govendarica, R. Rošić, S. Baumgartner, J. Kristl: The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2013, 84: 401–411
43. K.M. Elovitz: Understanding what humidity does and why. ASHRAE Journal, april 1999

44. J. Pelipenko, J. Kristl, B. Janković, S. Baumgartner, P. Kocbek: The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. International Journal of Pharmaceutics 2013, 456: 125–134
45. S. Tripathanasuwan, Z. Zhong, D.H. Reneker: Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethylene oxide) aqueous solution. Polymer 2007, 48: 5742-5746
46. M.K. Leach, Z.-Q. Feng, S.J. Tuck, J.M. Corey: Electrospinning fundamentals: Optimizing solution and apparatus parameters. Jove.com: <http://www.jove.com/video/2494/electrospinning-fundamentals-optimizing-solution-apparatus>
47. H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker: Beaded nanofibers formed during electrospinning. Polymer 1999, 40: 4585–4592
48. R. Rošić, J. Pelipenko, J. Kristl, P. Kocbek, M. Bešter-Rogač, S. Baumgartner: Physical characteristics of poly (vinyl alcohol) solutions in relation to electrospun nanofiber formation. European Polymer Journal 2013, 49: 290–298
49. R. Sahay, V. Thavasi, S. Ramakrishna: Design modifications in electrospinning setup for advanced applications. Journal of Nanomaterials 2011: 1-17
50. A.J. Meinel, O. Germershaus, T. Luhmann, H.P. Merkle, L. Meinel: Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2012, 81: 1–13
51. Š. Zupančič, S. Sinha-Ray, S. Sinha-Ray, J. Kristl, A.L. Yarin: Long-Term Sustained ciprofloxacin release from PMMA and hydrophilic polymer blended nanofibers. Molecular Pharmaceutics 2016, 13: 295–305
52. X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, X. Jing: Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications: Journal of Controlled Release 2014, 185: 12–21
53. X. Li, M.A Kanjwal, L. Lin, I.S. Chronakis: Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2013, 103: 182–188
54. K.T. Savjani, A.K. Gajjar, J.K. Savjani: Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. ISRN Pharmaceutics 2012
55. X. Xu, L. Yang, X. Xu, X. Wang, X. Chen, Q. Liang, J. Zeng, X. Jing: Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions. Journal of Controlled Release 2005, 108: 33–42
56. T. Jiang, E.J. Carbone, K.W.-H. Lo, C.T. Laurencin: Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. Progress in Polymer Science 2015, 46: 1–24

57. L.C. Ionescu, G.C. Lee, B.J. Sennett, J.A. Burdick, R.L. Mauck: An anisotropic nanofiber/microsphere composite with controlled release of biomolecules for fibrous tissue engineering. *Biomaterials* 2010, 31: 4113–4120
58. V. Beachley, X. Wen: Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science* 2010, 35: 868-892
59. I. Moreno, V. González-González, J. Romero-García: Control release of lactate dehydrogenase encapsulated in poly(vinyl alcohol) nanofibers via electrospinning. *European Polymer Journal* 2011, 47: 1264-1272
60. J. Lee, J.J Yoo, A. Atala, S.J. Lee: The effect of controlled release of PDGF-BB from heparin-conjugated electrospun PCL/gelatin scaffolds on cellular bioactivity and infiltration. *Biomaterials* 33 2012, 33: 6709-6720
61. X. Huang, C.S. Brazel: On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 2001, 73: 121–136
62. L.-Y. Huang, C.B.-White, X.-X. Shen, D.-G. Yu, L.-M. Zhu: Time-engineering biphasic drug release by electrospun nanofiber meshes. *International Journal of Pharmaceutics* 2012, 436: 88–96
63. S.K. Tiwari, R. Tzezana, E. Zussman, S.S. Venkatraman: Optimizing partitioncontrolled drug release from electrospun core-shell fibers. *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 392: 209–217
64. A. Zupančič: Vpliv različnih dodanih soli na fizikalno-kemijske lastnosti raztopin polivinil alkohola. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 2013, Ljubljana, Slovenija, diplomska naloga
65. H. Zavaloka: Preučevanje nanovlaken iz polivinil alkohola kot dostavnih sistemov za nesteroidne antirevmatike. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 2013, Ljubljana, Slovenija, diplomska naloga
66. T. Vidic: Vgrajevanje učinkovine v nanovlakna iz polivinil alkohola z elektrostatskim sukanjem. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 2012, Ljubljana, Slovenija, diplomska naloga
67. Polyvinyl alcohol (PVA): Chemical and Technical Assessment (CTA), 61st JECFA
68. B. Gajra, S.S. Pandya, G. Vidyasagar, H. Rabari, R.R.Dedania, S. Rao: Polycinyl alcohol hydrogel and its pharmaceutical and biomedical applications: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Reserach* 2012, 4: 20-26
69. U.S. Food and Drug Administration: Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000141, April 28, 2004
70. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processsing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to the use of polyvinyl alcohol as a coating agent for food supplements. *EFSA Journal* 2005, 294: 1-15

71. R. Chandra, R. Rustgi: Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* 1998, 23: 1273-1335
72. D. Cho, N. Hoepker, M.W. Frey: Fabrication and characterization of conducting polyvinyl alcohol nanofibers. *Materials Letters* 2012, 68: 293-295
73. X. Mi, K.S. Vijayaragavan, C.I. Heldt: Virus adsorption of water-stable quarternized chitosan nanofibers. *Carbohydrate Research* 2014, 387: 24-29
74. Z. Khatri, S. Ali, I. Khatri, G. Mayakrishnan, S.H. Kim, I.-S. Kim: UV-responsive polyvinyl alcohol nanofibers prepared by electrospinning. *Applied Surface Science* 2015, 342: 64-68
75. M. Ahmadipourroudposht, E. Fallahiarezoudar, N.M. Yusof,A. Idris: Application of response surface methodology in optimization of electrospinning process to fabricate (ferrofluid/polyvinyl alcohol) magnetic nanofibers. *Materials Science and Engineering C* 2015, 50: 234-241
76. Y. Deng, X. Zhang, Y. Zhao, S. Liang, A. Xu, X. Gao, F. Deng, J. Fang, S. Wei: Peptide-decorated polyvinyl alcohol/hyaluronan nanofibers for human induced pluripotent stem cell culture. *Carbohydrate Polymers* 2014, 101: 36-39
77. A.S. Asran, S. Henning, G.H. Michler: Polyvinyl alcohol-collagen-hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer* 2010, 51: 868-876
78. A.M. Abdelgawad, S.M. Hudson, O.J. Rojas: Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydrate Polymers* 2014, 100: 166-178
79. S. Mollá, V. Compañ: Polyvinyl alcohol nanofiber reinforced Nafion membranes for fuel cell applications. *Journal of Membrane Science* 2011, 372: 191-200
80. A.K. Sharma, P. Khare, J.K. Singh, N. Verma: Preparation of novel carbon microfiber/carbon nanofiber-dispersed polyvinyl alcohol-based nanocomposite material for lithium-ion electrolyte battery separator. *Materials Science and Engineering C* 2013, 33: 1702-1709
81. C.M. Hassan, N.A. Peppas: Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Advances in Polymer Science* 2000, 153: 38-62
82. C.M. Hassan, J.H. Ward, N.A. Peppas: Modeling of crystal dissolution of poly(vinyl alcohol) gels produced by freezing/thawing processes. *Polymer* 2000, 41: 6729–6739
83. N.A. Peppas, D. Tennenhouse: Semicrystalline poly(vinyl alcohol) films and their blends with poly(acrylic acid) and poly(ethylene glycol) for drug delivery applications. *Journal of Drug Delivery and Technology* 2004, 14: 291-297
84. D.-G. Yu, L.-M. Zhu, K. White, C.Branford-White: Electrospun nanofiber-based drug delivery systems. *Health* 1 2009, 1: 67-75

85. DrugBank; Ibuprofen, APRD 00372: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01050>
86. Chemical Book, Ibuprofen sodium salt:
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0116983.htm
87. Centralna Baza Zdravil: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView)
88. S.W. Larsen, J. Østergaard, A. Yaghmur, H. Jensen, C. Larsen: Use of *in vitro* release models in the design of sustained and localized drug delivery system for subcutaneous and intra-articular administration. Journal of Drug Delivery Science and Technology 2013, 23: 315-324
89. G. de Brito Cardoso, I.N. Souza, M.M. Pereira, L.P. Costa, M.G. Freire, C.M.F. Soares, A.S. Lima: PVA as a novel constituent to form aqueous two phase systems with acetonitrile: Phase diagrams and partitioning experiments. Chemical Engineering Research and Design 2015, 94: 317–323
90. C.W. Zhang, T. Lee, Y.H. Chen: Solubility, polymorphism, crystallinity, crystal habit, and drying scheme of (R, S)-(±)-sodium ibuprofen dihydrate. PharmTech.com 2007: <http://www.pharmtech.com/solubility-polymorphism-crystallinity-crystal-habit-and-drying-scheme-r-s-sodium-ibuprofen-dihydrate>