

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA REBEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA REBEC

**DOSTAVLJANJE METRONIDAZOLA V OBZOBNE ŽEPE S
POLIKAPROLAKTONSKIMI NANOVLAKNI**

**DELIVERY OF METRONIDAZOLE INTO PERIODONTAL POCKET
WITH POLYCAPROLACTONE NANOFIBERS**

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani Fakulteti za farmacijo, na katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl, mag. farm.

SEM analize je naredila doc. dr. Petra Kocbek, mag. farm. na Kemijskem inštitutu, Ljubljana.

Zahvala

Za strokovno usmerjanje, sodelovanje in pomoč pri nastajanju magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Julijani Kristl. Iskrena hvala tudi delovni mentorici Špeli Zupančič za vse nasvete, ideje in zamisli.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl, mag. farm.

Kaja Rebec

Magistrska komisija

Predsednica: prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl

Član: doc. dr. Žiga Jakopin

KAZALO VSEBINE

ABSTRACT	vi
KLJUČNE BESEDE / KEYWORDS	vii
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1 UVOD	1
1.1 PARODONTALNA BOLEZEN	1
1.2 ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI	4
1.2.1 Protimikrobne učinkovine, antiseptiki in probiotiki	5
1.2.2 Modulatorji imunskega sistema	6
1.2.3 Fotodinamična terapija	6
1.2.4 Rastni dejavniki	7
1.3 METRONIDAZOL	7
1.3.1 Lastnosti	7
1.3.2 Mehanizem delovanja	8
1.3.3 Uporaba za zdravljenje parodontalne bolezni	9
1.4 NANOVLAKNA	9
1.4.1 Izdelava nanovlaken z elektrostatskim sukanjem	10
1.4.2 Pogosto uporabljeni polimeri in topila	13
1.4.3 Vgradnja zdravilnih učinkovin v nanovlakna	14
1.4.4 Določanje lastnosti nanovlaken	14
1.5 POLIKAPROLAKTON	14
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.2 NAPRAVE	17

3.3	IZDELAVA NANOVLAKEN	18
3.3.1	Priprava raztopin polimera in učinkovine.....	18
3.3.2	Merjenje prevodnosti raztopin.....	18
3.3.3	Elektrostatsko sukanje	19
3.3.4	Vrednotenje morfologije z vrstičnim elektronskim mikroskopom.....	21
3.3.5	Določanje nabrekanja PCL nanovlaken in izguba mase.....	21
3.4	RAZVOJ ANALITSKE METODE ZA KVANTITATIVNO DOLOČANJE MTZ	
	21	
3.4.1	Priprava fosfatnega pufra.....	21
3.4.2	Umeritvena krivulja za MTZ.....	22
3.4.3	Določanje specifičnosti UV-VIS metode za določitev MTZ	22
3.5	DOLOČANJE STABILNOST MTZ V FOSFATNEM PUFRU	22
3.6	DOLOČANJE SPROŠČANJA.....	22
3.6.1	V napravi za raztapljanje z vesli	22
3.6.2	Sproščanje v erlenmajerici.....	23
3.6.3	Sproščanje v Franzovi celici	23
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1	PRIPRAVA NANOVLAKEN.....	25
4.1.1	Priprava in vrednotenje nanovlaken pripravljenih iz zmesi kloroforma in acetona.....	25
4.1.2	Priprava in vrednotenje nanovlaken pripravljenih iz zmesi diklorometana in dimetilformamida	27
4.1.3	Vpliv različnih spremenljivk na premer nanovlaken.....	37
4.1.4	Test nabrekanja.....	40
4.2	DOLOČANJE METRONIDAZOLA Z UV-VIS SPEKTROSKOPIJO	41
4.2.1	Absorpcijski spekter MTZ.....	41
4.2.2	Umeritvena krivulja za MTZ.....	42

4.2.3	Specifičnost UV-VIS metode za določitev MTZ	43
4.3	STABILNOST MTZ V FOSFATNEM PUFERU S pH 6,8.....	44
4.4	SPROŠČANJE.....	45
4.4.1	Razvoj metod za spremljanje sproščanja MTZ	46
4.4.2	Sproščanje MTZ iz PCL-nanovlaken pripravljenih iz zmesi DCM in DMF ...	47
4.4.3	Vpliv dodatka površinsko aktivne snovi (Span 80).....	47
4.4.4	Vpliv koncentracije polimera (PCL)	48
4.4.5	Primerjava vseh sproščanj	49
5	SKLEP.....	51
6	VIRI.....	53

POVZETEK

Parodontalna bolezen je zelo razširjena kronična vnetna bolezen, ki ne vodi le v izgubo zob, spremenjen izgled in slab zadah, ampak vpliva tudi na sistemsko zdravje posameznika. Pri zdravljenju ima poleg mehanskega čiščenja in glajenja zobne površine velik pomen tudi protimikrobno zdravljenje, kjer je metronidazol (MTZ) prvi izbor zaradi svoje selektivne učinkovitosti za anaerobne mikroorganizme. Zaradi kompleksne patofiziologije parodontalne bolezni pa je zdravljenje težavno in trenutno v določenih primerih ne vodi k ustrezni ozdravitvi.

Posledično je bil cilj magistrske naloge razviti nanovlakna, sodoben lokalni dostavni sistem, z vgrajenim MTZ za aplikacijo v obzobne žepe, s katero bi lahko dosegli boljšo terapevtsko učinkovitost in zmanjšali posredne neželene učinke zdravila.

Najprej nam je izziv predstavljala priprava homogene disperzije hidrofobnega polimera in hidrofilne učinkovine v mešanici topil, ustrezni za elektrostatsko sukanje, ter določitev procesnih parametrov, pri katerih so nastajala okrogla in gladka nanovlakna, kar smo ocenili na posnetkih z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Prva izbira topil je bila zmes kloroforma in acetona v razmerju 3:1, pri kateri smo uspešno izdelali prazna nanovlakna, vendar je bila topnost MTZ v takšni mešanici topil slaba in smo že pri vgradnji 5 % lahko opazili na površini nanovlaken delčke izkristalizirane učinkovine. Nato smo se odločili za zmes diklorometana (DCM) in dimetilformamida (DMF) v razmerju 3:2, kjer smo s preizkušanjem ugotovili, da ima MTZ veliko boljšo topnost. Pri napetosti 12 kV, pretoku 1,981 mL/h in razdalji 20 cm smo dosegli pogoje, pri katerih so nastajala okrogla in gladka prazna nanovlakna, ki so bila primerna za vgradnjo učinkovine. Z namenom izboljšanja vgradnje MTZ in s tem bolj zadržanega sproščanja smo izdelali tudi nanovlakna z dodatkom 5 % PAS in debelejša nanovlakna z večjo koncentracijo polimera. Za kvantitativno spremljanje profila sproščanja učinkovine smo si izbrali UV-VIS spektroskopijo, sproščanje pa je potekalo v Franzovih celicah. Na podlagi vrednotenja sproščanja smo uspeli dokazati, da so podaljšano sproščanje izkazovala le nanovlakna izdelana iz 10 % raztopine PCL v zmesi topil DCM:DMF (3:2) z vgrajenim 1 % MTZ.

ABSTRACT

Periodontal disease is a widespread chronic inflammatory disease, which does lead not only to loss of teeth, changed appearance and bad breath, but also affects systemic health. Besides scaling and planing the teeth surface during the treatment, antimicrobial treatment, in which metronidazole is the first choice due to its selective efficiency of anaerobic microorganisms, is also of great importance. Due to the complex pathophysiology of periodontal disease, its treatment is difficult and currently in certain cases does not lead to an adequate healing.

The aim of the master's thesis was subsequently to develop nanofibers, a modern local delivery system with integrated metronidazole for application in periodontal pockets which could lead to a better therapeutic efficacy and reduce the indirect adverse drug reactions. Our first challenge was the preparation of a homogeneous dispersion of the hydrophobic polymer and hydrophilic substance in a mixture of solvents, appropriate for electrospinning and the determination of the process parameters, during which the round and smooth nanofibers were formed, which was estimated from the images obtained by scanning electron microscopy. The first choice of the solvents was the mixture of chloroform and acetone in a ratio of 3: 1, in which empty nanofibers were successfully produced, but the solubility of metronidazole in such a mixture of solvents was low. In the case of incorporation of 5% of metronidazole, crystals were observed on the surface of nanofibers. Afterwards, we decided to prepare a mixture of dichloromethane and dimethylformamide in a volume ratio of 3: 2, resulting in a much better solubility of metronidazole. At a voltage of 12 kV, a flow rate of 1.981 mL/h and at a distance of 20 cm, we have provided the conditions for creating round and smooth empty nanofibers, adequate for the incorporation of the active ingredient. With the aim of improving the incorporation of metronidazole in order to achieve delayed release, the nanofibers were also produced by addition of 5% of the PAS in one case and thicker nanofibres with a bigger concentration of polymer in the other. The quantitative monitoring of the release profile of the active ingredient was conducted by UV-VIS spectroscopy, the release was investigated in Franz cells. Based on the evaluation of the release, we managed to prove that the prolonged release was displayed only by nanofibers made of 10% PCL solution in a mixture of solvents DCM: DMF (3: 2), fitted with 1% metronidazole.

KLJUČNE BESEDE / KEYWORDS

Parodontalna bolezen, polikaprolakton, metronidazol, elektrostatsko sukanje, nanovlakna
Periodontal disease, polycaprolactone, metronidazole, electrospinning, nanofibers

SEZNAM OKRAJŠAV

PCL: polikaprolakton

MTZ: metronidazol

DCM: diklorometan

DMF: dimetilformamid

MIC: minimalna inhibitorna koncentracija

PBS: fosfatni pufer

T: temperatura

RH: relativna vlažnost

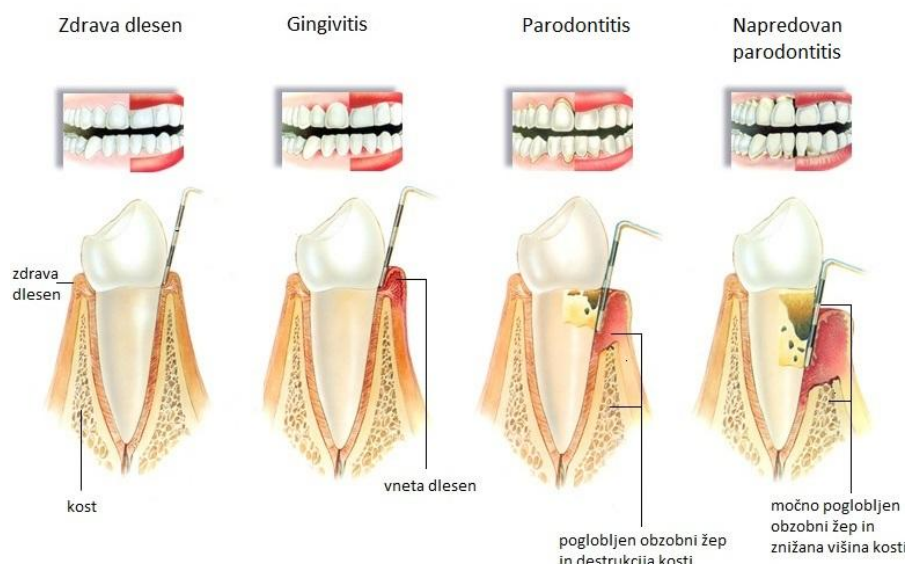
SEM: vrstični elektronski mikroskop

1 UVOD

1.1 PARODONTALNA BOLEZEN

Parodontalna bolezen je kronična vnetna bolezen obzobnih tkiv, ki se večinoma začne kot vnetje dlesni v mladosti, počasi napreduje v razgradnjo pozobnice, alveolne kosti in cementa in se nato z nastankom obzobnih žepov izrazi običajno šele po 30. letu starosti. Nezdravljena parodontalna bolezen lahko vodi v izgubo zob (1, 2). Glede na stopnjo bolezni jo delimo v dve skupini, ki so prikazane na Slika 1:

- *Gingivitis* je blažja oblika vnetja dlesni, za katero so značilne mehke, rdeče, otekle dlesni, ki lahko krvavijo, zlasti med umivanjem zob. Razvije se tudi slab zadah (halitoza) in kovinski okus v ustih. Ob pravilnem in pravočasnem zdravljenju z ustrezno ustno higieno, prehrano bogato z antioksidanti (zelenjava, sadje) ter prenehanjem kajenja so te spremembe reverzibilne. Nezdravljen gingivitis pa lahko vodi v nastanek parodontitisa (2, 3).
- *Parodontitis* je hujša oblika bolezni dlesni, ki se razvije kot posledica delovanja bakterijskih toksinov in encimov na obzobna tkiva in korenino zoba. Dlesni se razmaknejo in med zobom in dlesnijo pride do nastanka obzobnega žepa, ki postaja z napredovanjem bolezni vedno globlji. V njem se nabere še več zobnega plaka, kar dodatno pripomore k širjenju vnetja. Značilne so hude krvavitve dlesni, globoki obzobni žepi (globlji od 3 mm) in v težjih primerih tudi izguba zob kot posledica uničenja podpornih obzobnih tkiv (2, 4).



Slika 1: Faze razvoja parodontalne bolezni (povzeto po 5).

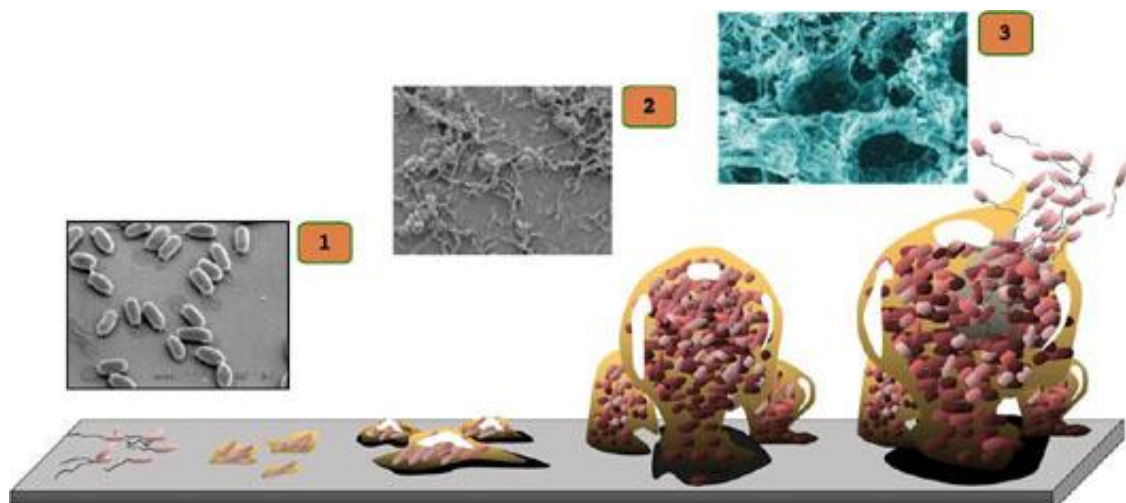
Glede na različne vzročne dejavnike, nastanek in razvoj bolezni ter odziv na zdravljenje ločimo naslednje oblike parodontalne bolezni:

- *Kronični parodontitis* je najpogostejša oblika bolezni, ki se običajno začne v adolescenci in postane klinično opazna šele med 30. in 40. letom starosti.
- *Agresivni parodontitis* se lahko pojavi že zgodaj v mladosti in povzroči propad obzobnih tkiv v zelo kratkem času kot posledica prisotnosti močno patogenih mikroorganizmov ali bolj dovzetnega gostitelja. Prizadene precej manj ljudi kot kronični parodontitis. Posebnost agresivnega parodontitisa je majhna prisotnost bakterijskih zobnih oblog, ki ni v sorazmerju s stopnjo razgradnje obzobnih tkiv. Lahko se pojavlja v lokalizirani (omejeni na najmanj dva stalna zoba, od katerih je vsaj eden prvi kočnik) ali generalizirani obliki (vključuje vsaj tri stalne zobe). Bolezen poteka v zagonih z vmesnimi obdobji mirovanja.
- *Parodontitis v sklopu sistemske bolezni*, kot so diabetes tipa 1, Downov sindrom, AIDS, levkemija...
- *Nekrotizirajoča parodontalna bolezen*. Gre za redko akutno infekcijo dlesni, ki se kaže z bolečimi in krvavečimi dlesnimi in slabim zadahom. Bolečina nastopi zelo hitro. Če se je ne zdravi, se lahko razširi tudi v druga področja obraza in povzroči veliko škodo. Običajno je povezana s sistemskimi boleznimi, kot sta AIDS in podhranjenost (1, 2).

Primarni vzrok za razvoj parodontalne bolezni pri zdravih ljudeh je pomanjkljiva ustna higiena, ki vodi h kopičenju patogenih bakterijskih zobnih oblog in s tem spremembi ravnotežja med neškodljivimi in škodljivimi bakterijami v ustni votlini. Za to spremembo je značilno, da nad prevladujočimi gram-pozitivnimi aerobi prevladajo gram-negativni anaerobi. Med prevladujoče gram-negativne anaerobe sodijo *Prevotella intermedia* in *Fusobacterium nucleatum*. Z napredovanjem bolezni se jima pridružijo še *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* ter *Treponema denticola* (3, 7).

Ob okužbi se sproži imunski odziv gostitelja, za katerega je značilno, da močno prispeva k razgradnji in uničenju obzobnega tkiva in zobne kosti. Matriksne metaloproteinaze, ki nastajajo z infiltracijo nevtrofilcev, stimulirajo razgradnjo kolagena in resorpcijo kosti. Dlesni se začno postopoma odmikati od zobne površine, kar vodi v nastanek obzobnega žepa. Ta je zaradi vlažnega, toplega in anaerobnega okolja idealno gojišče za kolonizacijo in razmnoževanje parodontopatogenih bakterij (6, 7).

Površino dlesni najprej kolonizirajo posamezne bakterije, ki sčasoma tvorijo mikrokolonije. Bakterije znotraj teh kolonij izločajo posebno lepljivo izvencelično polimerno snov, sestavljeno iz polisaharidov, proteinov, lipidov, nukleinskih kislin in drugih polimerov, ki pripomorejo, da se nove bakterije lažje adherirajo na površino ter med seboj. Nastaja vedno bolj kompleksna polimikrobna združba, ki ji pravimo biofilm (Slika 2). Ocenjujejo, da je v naši ustni votlini okoli 700 različnih vrst bakterij. Zaradi velike strukturne in funkcionalne heterogenosti ima biofilm nekatere specifične značilnosti, kot so povečana zmožnost vezave/lepljenja na površine, metabolično sodelovanje bakterij in s tem boljša izraba hranil. Klinično zelo pomembno je tudi, da bakterije v biofilmu pogosteje razvijejo odpornost na protimikrobne učinkovine. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je lahko v takšnem primeru tudi 20 do 100-krat višja kot običajno, saj protimikrobne učinkovine težje penetrirajo v lepljivo izvencelično polimerno snov in dovzetnost počasi rastočih subpopulacij bakterij za protimikrobne učinkovine se zmanjša. Značilnost biofilmov je tudi ta, da se mikroorganizmi oz. bakterije lahko izognejo imunskemu odgovoru gostitelja, saj protitelesa le s težavo preidejo polimerno ogrodje in fagociti težko zajamejo velike fragmente biofilma. Dentalni plak lahko tako opišemo kot biofilm, ki zaradi vseh njegovih specifičnih metaboličnih in fenotipskih lastnosti močno otežuje zdravljenje parodontalne bolezni (6, 7, 8).



Slika 2: Nastanek biofilma: (1) okužba in kolonizacija posameznih bakterij, (2) izločanje lepljive polimerne snovi in adheriranje novih bakterij in (3) rast biofilma (9).

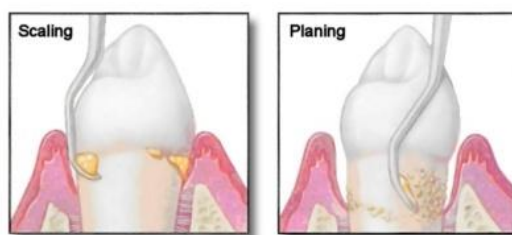
Ostali dejavniki tveganja, ki pripomorejo k nastanku parodontalne bolezni, so naslednji:

- starost (običajno se pojavlja pri ljudeh, starejših od 35 let),

- ženski spolni hormoni (izrazito povečanje ravni progesterona nekaj dni pred menstruacijo – progesteron povzroča vazodilatacijo in nastanek nekaterih vnetnih dejavnikov, hormonske spremembe v nosečnost in upad estrogena v menopavzi – zmanjšanje relativne kostne gostote, ki lahko vodi tudi v izgubo zob),
- nezdrav življenjski slog (kajenje, alkohol, zloraba nekaterih drog, prehrana, revna z antioksidanti, psihološki stres),
- bolezenska stanja (diabetes tipa 1 in 2, bolezni srca, HIV/AIDS, levkemija, avtoimunske bolezni...),
- določena zdravila (peroralni kontraceptivi, antidepresivi, bisfosfonati) (2, 3, 4).

1.2 ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI

Cilj zdravljenja je zaustaviti vnetje, zmanjšati globino obzobnega žepa ter spodbuditi zdravo dlesen, da bi se ponovno oprijela površine zobne korenine. Zaradi raznolikosti vzrokov, ki pripomorejo k nastanku parodontalne bolezni in stopnje napredovanja bolezni, je izbira prave terapije včasih težavna. Prvi korak k zdravljenju bolezni je odstranitev bakterijskega plaka ali biofilma s površine zob in dlesni s pomočjo mehanskega čiščenja (Slika 3). Mehansko čiščenje vključuje luščenje in glajenje zobne površine. Pri prvem gre za odstranjevanje zobnega kamna okrog in pod linijo dlesni ob zobu z ultrazvočnim ali ročnim strganjem, pri drugem pa za glajenje zobne sklenine, z namenom, da bo le-ta manj dovzetna za oprijemanje novega bakterijskega plaka.



Slika 3: Mehansko čiščenje obzobnega žepa. Leva slika prikazuje odstranjevanje zobnega kamna, desna slika pa luščenje in glajenje zobne površine (10).

Običajno to ni trajna rešitev, saj lahko pride do ponovne kolonizacije bakterij in je zato potrebno bolezen obravnavati širše ter poleg mehanskega čiščenja uporabiti tudi druge pristope. V primeru poslabšanja bolezni sledi kirurško ali nekirurško zdravljenje. Med nekirurške pristope sodijo zdravljenje s protimikrobnimi učinkovinami, antiseptiki,

probiotiki, modulatorji imunskega odziva, s fotodinamično terapijo in dostavo rastnih dejavnikov (3).

1.2.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE, ANTISEPTIKI IN PROBIOTIKI

Za uničenje patogenih bakterij oziroma izboljšanje razmerja med patogenimi in nepatogenimi bakterijami uporabljamo protimikrobne učinkovine, antiseptike ter probiotike.

Meta-analize študij nekaterih lokalnih in sistemskih protimikrobnih učinkovin (minociklin, tetraciklin, metronidazol, amoksisicilin/metronidazol) v kombinaciji z mehanskim čiščenjem so pokazale, da je učinkovitost v tem primeru večja, kot s samim mehanskim čiščenjem obzobnih tkiv (7). Slabost uporabe sistemskih protimikrobnih učinkovin je, da so potrebni veliki odmerki za doseg učinkovite koncentracije v gingivalni tekočini, ki presega MIC. To prinese s seboj na dolgi rok tudi razvoj odpornih mikroorganizmov in številne stranske učinke. Zato ima prednost uporaba lokalnih protimikrobnih učinkovin, ki jih dajemo direktno na mesto delovanja, torej v obzobni žep. Razvili so različne dostavne sisteme, kot so geli, filmi, trakovi, vlakna itd. Te vstavijo v obzobni žep po mehanskem čiščenju. V primerjavi s sistemskimi protimikrobnimi učinkovinami, nove dostavne oblike protimikrobnih učinkovin zmanjšajo pogostost dajanja zdravila s tem, da vzdržujejo želena koncentracija učinkovine skozi daljši čas. Slaba stran uporabe nerazgradljivih trakov in vlaken je ta, da jih morajo po končani terapiji odstraniti iz zobnega žepa. S tega vidika so boljši geli, kjer je proces dajanja lažji, vendar imajo tudi ti slabost, saj je sproščanje zelo hitro. V zadnjem času postaja načrtovanje dostavnih oblik protimikrobnih učinkovin iz biorazgradljivih polimerov, ki jih ne bi bilo potrebno odstranjevati, vse bolj razširjeno (7, 11, 13).

Godson in sodelavci, ki so raziskovali vgradnjo tetraciklinijevega klorida v etilen vinil acetatna nanovlakna, so prvi objavili uporabo monolitičnih nanovlaken kot dostavnega sistema za zdravljenje parodontalne bolezni. Izdelali so tudi polikaprolaktonska (PCL) nanovlakna z metronidazol benzoatom ter dosegli podaljšano sproščanje učinkovine (11).

Prednosti vstavljanja zdravila v parodontalni žep so: odlična dostopnost, nizka metabolna aktivnost, večja terapevtska učinkovitost, neboleče dajanje na mesto delovanja in s tem boljša sprejetost s strani pacienta in primernost tudi za paciente, ki imajo težave s požiranjem (8, 14).

Med antiseptike, ki se uporabljajo kot alternativa protimikrobnim učinkovinam pri zdravljenju parodontalne bolezni sodijo: klorheksidin, natrijev hipoklorit, povidon-jod in amino fluorid. Nekatere *in vitro* raziskave so pokazale, da je bila učinkovitost klorheksidina v primerjavi z minociklinom pri uničenju bakterije *P. gingivalis* večja in je bilo za popolno odstranitev le-te potrebnih le 30 minut izpostavljenosti klorheksidinu ali povidon jodu. Rezultati pri raziskavah na pacientih pa so bili nekoliko drugačni, saj je imela uporaba protibakterijskih učinkovin prednost pred antiseptiki pri zmanjševanju globine obzobnega žepa (7).

Pri preučevanju učinkovitosti probiotikov pri pacientih s parodontalno boleznijo so ugotovili, da ima uporaba ustne vode, ki vsebuje *Lactobacillus salivarius*, pozitiven vpliv na zmanjšanje števila patogenih mikroorganizmov v ustni votlini (7).

1.2.2 MODULATORJI IMUNSKEGA SISTEMA

Njihov namen je uravnati imunski odgovor gostitelja in s tem preprečiti njegove destruktivne učinke na obzobna tkiva in kost zobiščnega odrastka, ki vodijo v izgubo zoba. Protimikrobna učinkovina doksiciklin v dozah, nižjih od protimikrobnih, izkazuje zaviralno delovanje na matriksne metaloproteinaze. Meta-analize študij med modulatorje imunskega sistema štejejo tudi nesteroidne protivnetne učinkovine in učinkovine, ki zavirajo osteoklastno dejavnost in s tem resorpcijo kostnine (bisfosfonati). Možnost za zdravljenje bi lahko bile tudi učinkovine, ki bi pomagale pri regeneraciji uničenega tkiva, kot so resolvin E1 (derivat omega 3 maščobnih kislin), lipoksini in protektini (7).

1.2.3 FOTODINAMIČNA TERAPIJA

Kot obetavna tehnika za zdravljenje parodontalne bolezni se je izkazala tudi fotodinamična terapija. Temelji na uporabi dolgovalovne VIS (rdeča svetloba), ki aktivira fotosenzibilne učinkovine (barvila: akridin oranžno, metilen modro; porfirini, klorini, furokumarini), pri čemer nastajajo reaktivne kisikove spojine, ki lahko reagirajo s celičnimi komponentami, jih uničijo in tako povzročijo smrt celice. Prednost te tehnike je lokalizirana terapija, ki ne povzroča nikakršnih posledic na okoliškem zdravem tkivu (7).

1.2.4 RASTNI DEJAVNIKI

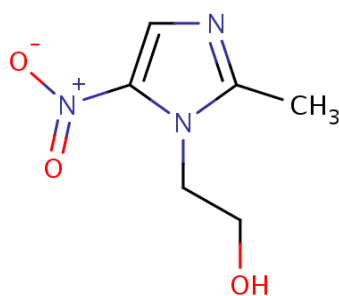
Posledica parodontalne bolezni je kot že omenjeno tudi uničenje obzobnih tkiv in s tem izguba njihove biološke funkcije. Z lokalnim dajanjem eksogenih rastnih dejavnikov, ki z vezavo na receptorje na površini celic spodbudijo proliferacijo in diferenciacijo celic, lahko vplivamo na izboljšanje obnove tkiva. Obstaja kar nekaj študij o vgradnji rastnih faktorjev v vlakna, narejena z elektrostatskim sukanjem ali s kovalentno vezavo na njihovo površino. Problem lahko predstavlja njihova proteinska struktura, ki se lahko tekom procesa izdelave zaradi visoke temperature in uporabe organskih topil spremeni in tako rastni faktorji izgubijo svojo biološko aktivnost (15, 16).

Poleg vseh naštetih pristopov zdravljenja je seveda zelo pomembna tudi preventiva. Sem sodi zdrava in uravnotežena prehrana, opustitev kajenja in drugih slabih razvad ter redna in temeljita higiena zob. Z uporabo ustne vode, ki običajno vsebuje klorheksidin ali kateri drugi antiseptik, odstranimo tudi bakterije, ki jih z zobno ščetko ali nitko ne dosežemo.

1.3 METRONIDAZOL

Metronidazol (MTZ) (Slika 4) ima zaradi svoje selektivne učinkovitosti za anaerobne mikroorganizme ter ozkega terapevtskega okna prednost pred ostalimi protimikrobnimi učinkovinami pri zdravljenju parodontalne bolezni (11, 23).

Metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol) je široko-spektralna protimikrobna učinkovina z MIC *in vitro* $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ (18).



Slika 4: Kemijska struktura metronidazola (IUPAC: 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etan-1-ol) (18)

1.3.1 LASTNOSTI

MTZ je bel ali rahlo rumen kristaliničen prašek, grenkega okusa z molekulsko maso 171,16 g/mol. Njegova vrednost pKa je 2,62. Elektron privlačen efekt aromatske NO₂

skupine pritegne prosti elektronski par na dušiku (N) imidazola, zato je ta manj dostopen za privzem vodika (H) v primerjavi z nesubstituiranimi imidazoli. Zaradi tega štejemo MTZ med šibke baze. V vodi je slabo topen (9500 mg/L pri 25 °C) in daje brezbarvno ali rahlo rumenkasto obarvano raztopino, ki ima v primeru nasičene vodne raztopine pH 5,8. V organskih topilih je slabše topen (aceton 0,5 g/100 mL; kloroform 0,4 g/100 mL; etanol 0,5 g/100 mL; metanol < 0,5 mg/mL). Njegova temperatura tališča je med 159 °C in 163 °C (17, 18, 19).

Identificiramo ga lahko z UV-VIS in IR spektroskopijo. MTZ, raztopljen v 0,1 M klorovodikovi kislini, ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 277 nm, v alkalni raztopini pa pri 319 nm (17).

Stabilnost MTZ v trdnem praškastem stanju so v članku (20) testirali pri milih pogojih (4-25 °C, 20-60% RH) ter v pospešenih študijah (40 °C, 75% RH). Pri obeh študijah ni bilo vidnih sprememb v daljšem časovnem obdobju (2-3 mesece), ne glede na pogoje shranjevanja učinkovine (temna/transparentna in odprta/zaprta posoda). V vodnem mediju ima MTZ dobro stabilnost. Njegova razgradnja je zelo počasna in zanemarljiva v obdobju več kot 15 dni pod različnimi pogoji. V raziskavi so dokazali, da tudi svetloba nima vpliva na razgradnjo MTZ, čeprav so v nekateri starejši literaturi omenili njegovo fotosenzibilnost. Do nekoliko večje razgradnje učinkovine je prišlo pri povišani temperaturi. Kritični dejavnik, ki vpliva na stabilnost MTZ v raztopini, je pH. Največjo stabilnost izkazuje pri pH 4, medtem, ko so pri pH 2 in pH 6 zaznali rahlo pospešeno razgradnjo učinkovine (20).

1.3.2 MEHANIZEM DELOVANJA

MTZ je derivat 5-nitroimidazola, ki izkazuje protimikrobne lastnosti proti anaerobnim bakterijam in protozoam. Po vstopu v citoplazmo dovzetnih anaerobnih bakterij sledi redukcija nitro skupine na mestu 5 imidazolnega obroča, pri čemer nastane kratko živeči radikal, ki deluje inhibitorno na sintezo DNA ter povzroči spremembe na njeni spiralni strukturi. Poleg tega ovira tudi druge oksido-redukcijske procese, ki jih mikroorganizmi potrebujejo za življenje. MTZ je *in vitro* učinkovit proti protozoam, kot so *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli* in *Blastocystis hominis*. Med anaerobnimi bakterijami izkazuje učinkovitost proti gram-negativnim *Bacteroides fragilis* in *Fusobacterium* ter gram-pozitivnim vrstam *Clostridium*,

Eubacterium, *Peptostreptococcus* in *Peptococcus*. MTZ je delno aktiven tudi proti fakultativnim anaerobom kot so *Gardnerella vaginalis*, *Helicobacter pylori* in *Campylobacter fetus*. Pri človeku MTZ ne povzroča inhibicije sinteze DNA (17, 18).

MTZ se popolnoma absorbira v gastrointestinalnem traktu in doseže vrh plazemske koncentracije 1-2 uri po aplikaciji. Nemoteno prehaja tudi v cerebrospinalno tekočino, slino in materino mleko. Manj kot 20% se ga veže na proteine. Metabolizira se s hidroksilacijo, oksidacijo in glukuronidacijo v jetrih, pri čemer nastajajo metaboliti z *in vitro* protimikrobno aktivnostjo. Iz telesa se v večini izloči preko urina (60 – 80 %), manjši del pa z blatom (6 – 15 %). Njegov razpolovni čas je 6-8 ur (17, 18).

LD50 po peroralni aplikaciji znaša 5 g/kg (*per os* pri miškah). Pri miškah ima dokazano mutageno in karcinogeno delovanje. Neželeni učinki, ki se lahko pojavijo pri uporabi MTZ, so naslednji: reverzibilna periferna nevropatija, toksičnost v osrednjem živčevju, disulfiramski učinek z alkoholom, temno rdeče-rjav urin, kovinski okus, slabost, zmedenost, vrtoglavica in reverzibilna nevtropenija (17, 18).

1.3.3 UPORABA ZA ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI

V več raziskavah so potrdili, da je MTZ učinkovina prvega izbora za zdravljenje parodontalne bolezni. Pri testni skupini, ki je poleg mehanskega čiščenja obzobnega žepa prejela MTZ, so opazili manjše število anaerobnih mikroorganizmov ter vidno izboljšanje kliničnih parametrov kot je zmanjšana globina zobnega žepa in boljša oprijemljivost dlesni. Za najbolj učinkovito kombinacijo se je izkazala lokalna dostava MTZ skupaj z mehanskim čiščenjem, kateri sledi sistemska aplikacija (21, 22). Preučevali so tudi kombinacije MTZ z drugimi protimikrobnimi učinkovinami, npr. z amoksicilinom, in ugotovili, da je uporaba te kombinacije opazno izboljšala klinično in mikrobiološko stanje bolezni v primerjavi s samo začetnim mehanskim čiščenjem zobne površine in obzobnega žepa, še posebej pri ljudeh, ki so jim diagnosticirali okužbo s *P. gingivalis* (23, 24).

1.4 NANOVLAKNA

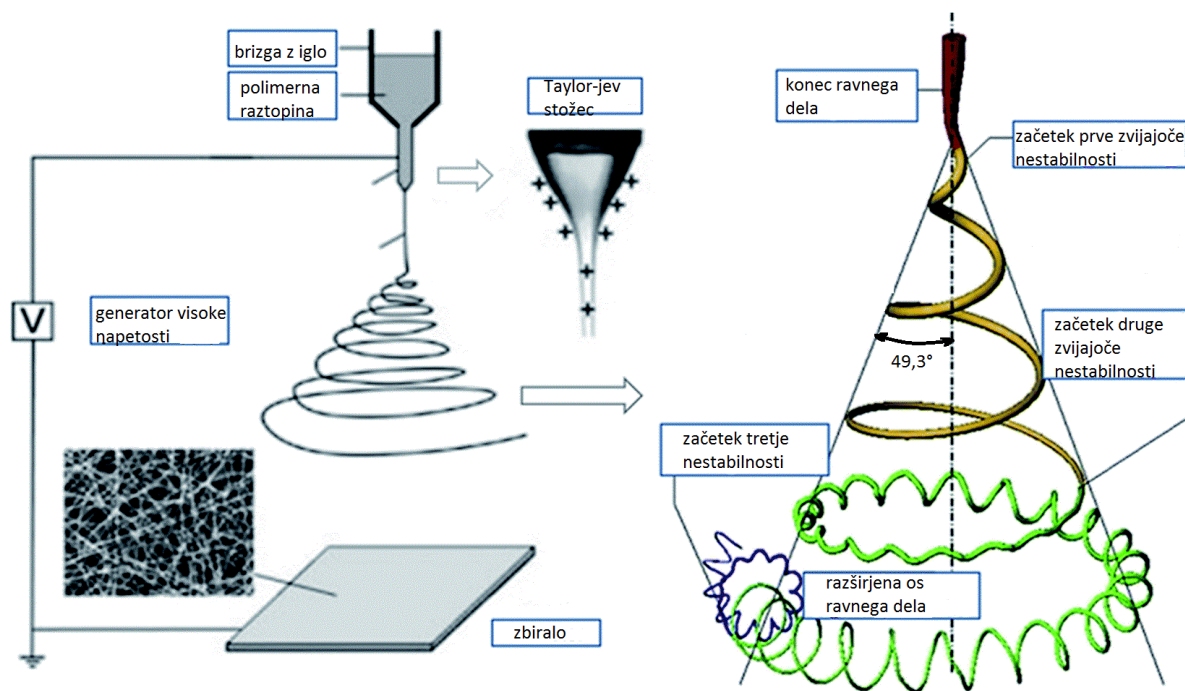
Nanovlakna so suha vlakna z nanometrskim premerom, za katera je značilna velika specifična površina, poroznost, teoretično neomejena dolžina, odlične strukturne in mehanske lastnosti ter izjemna prožnost (26, 39). Z uporabo nanovlaken kot dostavnega

sistema zdravilnih učinkovin dosežemo visoko učinkovitost vgradnje učinkovine ter možnost uravnavanja profila sproščanja z modifikacijo morfologije, poroznosti in sestave nanovlaken (12, 26, 27). S povečanjem specifične površine pri vgradnji učinkovine v nanovlakna, vplivamo tudi na topnost in s tem na hitrost raztapljanja učinkovine (27). Uporaba nanovlaken se zaradi svojih edinstvenih lastnosti širi na zelo različna področja. V biomedicini imajo nanovlakna vedno večji pomen v tkivnem inženirstvu, sodobnem celjenju ran, izdelavi implantatov ter pri razvoju dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin (26, 27, 28).

Za izdelavo nanovlaken se v biomedicinske namene največ uporabljajo naslednje metode: ločitev faz, samozdruževanje in elektrostatsko sukanje (28). Zaradi enostavnosti, vsestranske uporabe ter nizke cene se za njihovo izdelavo najpogosteje uporablja metoda elektrostatskega sukanja (28, 37).

1.4.1 IZDELAVA NANOVLAKEN Z ELEKTROSTATSKIM SUKANJEM

Elektrostatsko sukanje je enostavna metoda za izdelavo zelo tankih vlaken s premeri v mikro in nano območju. Začetek njene uporabe sega v leto 1934, ko je bila patentirana s strani Formhalsa (37). Naprava za elektrostatsko sukanje sestoji iz: generatorja visoke napetosti, mehanske črpalke, brizge s kovinsko iglo in zbirala, prikazanih na Slika 5 (28).



Slika 5: Naprava za elektrostatsko sukanje in nastanek nanovlaken (37)

Elektrostatsko sukanje temelji na uporabi visoke električne napetosti, običajno med 1 in 30 kV, ki povzroči nastanek tankega curka polimerne raztopine, ki se nato v obliki nanovlaken nabira na zbiralu. S priključitvijo na visoko napetost v raztopino vnesemo električni naboj, ki se razporedi po površini kapljice. Kadar naboj v polimerni kapljici na koncu igle doseže kritično vrednost in elektrostatske sile prevladajo nad površinsko napetostjo raztopine, pride do nastanka Taylor-jevega stožca, ki se raztegne kot tanek curek polimerne raztopine, ki potuje proti ozemljenemu zbiralu (16, 29, 37). Curek ne potuje naravnost, ampak se zaradi interakcij med zunanjim električnim poljem in naboji v raztopini začne zvijati in njegova pot do zbirala se podaljša, posledica česar so vedno tanjša nanovlakna (Slika 5) (16, 41). Na razdalji, ki je med koncem igle in zbiralom, topilo odpari in tako dobimo na zbiralu trdna in suha nanovlakna (38). Imeti moramo dovolj visoko gostoto naboja in viskoznost polimerne raztopine ter dovolj nizko površinsko napetost, da preprečimo nastanek kapljice še pred izhlapitvijo topila. Pri optimalnih pogojih so nastala nanovlakna gladka in brez vozlov (25, 27, 29).

Poleg enokanalne šobe lahko v procesu elektrostatskega sukanja uporabimo dvo- ali večkanalne šobe, ki dajejo večslojna nanovlakna (29, 31).

Z modifikacijo različnih spremenljivk lahko vplivamo na morfologijo nanovlaken. Delimo jih na:

Spremenljivke polimerne raztopine

Koncentracija: koncentracija polimera v raztopini vpliva na viskoznost in površinsko napetost raztopine in s tem na sposobnost nastanka nanovlaken. Z večanjem koncentracije polimerne raztopine v mejah, kjer prihaja do nastanka nanovlaken, dobimo debelejša nanovlakna (34, 38, 39).

Viskoznost: višja kot je viskoznost raztopine, debelejša in bolj gladka so nanovlakna (33). Če je viskoznost prevelika, prihaja zaradi velike kohezivnosti raztopine do nekontinuiranega pretoka in raztezanja polimerne raztopine, medtem ko pri prenizki viskoznosti, nastajajo kapljice na koncu igle (34, 37).

Prevodnost: raztopine z večjo prevodnostjo imajo večjo kapaciteto prenosa naboja kot raztopine z nižjo prevodnostjo, zaradi česar so v električnem polju, skozi katerega potuje curek raztopine, prisotne večje natezne sile. Iz tega sledi, da večja kot je prevodnost, tanjša

nanovlakna nastajajo. Prevodnost raztopine lahko povečamo z dodatkom ionov (soli; npr. NaI) (28, 30, 37, 38).

Molekulska masa polimera: s povečevanjem le-te se izognemo nastanku vozlov in tako dobimo nanovlakna gladke strukture (30, 38).

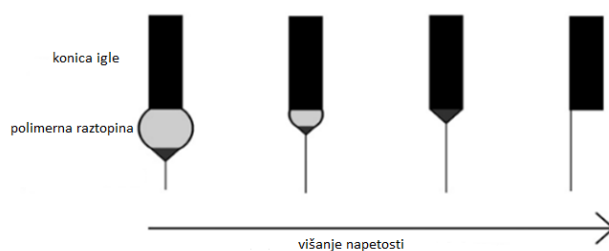
Hlapnost topil: uporaba topil z zelo nizko hlapnostjo lahko vodi k nastanku ploščatih nanovlaken, saj topilo v razdalji med koncem igle in zbiralom ne uspe izhlapeti in izhlapi naknadno (42). Večja hlapnost topil zahteva tudi večji pretok (38).

Dielektrična konstanta: za uspešno elektrostatsko sukanje je potrebna zadostna dielektrična konstanta (35, 38).

Površinska napetost: če je površinska napetost prevelika, prihaja zaradi težnje po zniževanju površine na enoto mase, do nastanka kapljic na koncu igle. Z nižanjem površinske napetosti pri konstantni koncentraciji dobimo bolj gladka nanovlakna, brez vozlov (30, 40).

Procesne spremenljivke

Električna napetost: dovedena napetost in s tem jakost električnega polja pomembno vpliva na tvorbo nanovlaken. Pri prenizki napetosti se Taylorjev stožec tvori na koncu kapljice, kar lahko vodi do nastanka vozlov. Z višanjem napetosti se volumen kapljice na koncu igle zmanjšuje vse do nastanka Taylor-jevega stožca na konici igle, pri katerem nastajajo idealna nanovlakna. Pri še višji napetosti se curek polimerne raztopine pomakne na rob igle in zopet poveča možnost nastajanja vozlastih nanovlaken (Slika 6) (37, 42). Pri večji napetosti nastajajo tanjša in bolj enakomerna nanovlakna (39).



Slika 6: Vpliv napetosti na nastanek Taylor-jevega stožca

Pretok: pri določeni napetosti mora biti pretok ravno pravšnji, da vzdržujemo Taylor-jev stožec na koncu igle in s tem nastanek gladkih nanovlaken, brez vozlov (42). Pretok polimerne raztopine skozi iglo vpliva na debelino, poroznost in geometrijo nanovlaken. Z

večanjem pretoka nastajajo debelejša in bolj porozna nanovlakna. Za prevelik pretok je značilen nastanek vozlastih nanovlaken kot tudi nezmožnost izhlapitve celotnega topila preden doseže zbiralo, zaradi česar nastanejo ploščata in med seboj spojena nanovlakna (41).

Razdalja med iglo in zbiralom: razdalja mora biti zadostna, da ima topilo čas izhlapeti (30). S povečanjem razdalje se premer nanovlaken zmanjša (41).

Spremenljivki okolja

Temperatura: pri višji temperaturi je hlapljivost topil večja in nastala nanovlakna so tanjša (27).

Relativna vlažnost: nizka vlažnost pripomore k hitrejšemu izhlapevanju topila iz polimerne raztopine, medtem ko visoka vlažnost vodi v nastanek debelejših nanovlaken, zaradi nevtralizacije naboja v curku raztopine in s tem manjših elastičnih sil (30).

1.4.2 POGOSTO UPORABLJENI POLIMERI IN TOPILA

Za elektrostatsko sukanje lahko uporabimo polimer, ki je raztopljen v topilu oz. mešanici topil ali talino polimera (29). Vsaka ima svoje prednosti in slabosti. Pri raztopini polimera lahko dobimo nanovlakna različnih velikosti, medtem ko smo pri talini polimera omejeni na mikrometrске ali večje velikosti. Prednost taline polimera je pa ta, da nam ni potrebno uporabljati neželenih organskih topil (29, 39).

V biomedicinske namene se najpogosteje uporabljajo naslednji sintezni polimeri: polietilenoksid (PEO), polivinil alkohol (PVA), polimlečna kislina (PLA), poliuretan (PU), polikaprolakton (PCL), kopolimer poli(mlečna- ko-glikolna kislina) (PLGA) ter naravni polimeri, kot so hitosan, kolagen, alginat, hialuronska kislina, itd. (24, 38). Sintezni polimeri so pogosto enostavnejši in cenejši za izdelavo vlaken z elektrostatskim sukanjem, medtem ko so naravni polimeri v prednosti pred sintezni zaradi njihove podobnosti z biološkimi makromolekulami, ki jih telo prepozna kot svoje in zato lažje interagira z njimi (24, 37, 38). Za doseganje boljših mehanskih lastnosti, degradacijske stabilnosti ter za povečanje afinitete do celičnih komponent se pogosto uporabljajo tudi kombinacije sinteznih in naravnih polimerov (npr. hitosan/PCL) (33, 43).

Za uspešno izdelavo polimernih nanovlaken z elektrostatskim sukanjem ima velik pomen tudi izbira pravega topila. Interakcije med topilom in polimerom vplivajo na morfologijo,

kristaliničnost, premer in natezne lastnosti nanovlaken. Med pogosteje uporabljana topila sodijo: destilirana voda, očetna kislina, aceton, kloroform, etanol, metanol, tetrahidrofuran, dimetilformamid itd. (38). V farmaciji imajo vodna topila prednost pred organskimi, saj je lahko zaostanek organskih topil toksičen. Vedno pa se uporabi organskih topil žal ne moremo izogniti (28).

1.4.3 VGRADNJA ZDRAVILNIH UČINKOVIN V NANOVLAKNA

Učinkovino lahko vgradimo v nanovlakna na tri načine: s fizikalno vgradnjo, adsorpcijo ali kemijsko vezavo na površino nanovlaken. Direktno jo vgradimo tako, da jo raztopimo v zmesi polimera in primerne topila, pri čemer je pomembna topnost in kompatibilnost med polimerom, učinkovino in topilom. Adsorpcija temelji na elektrostatskih interakcijah med učinkovino in površino nanovlaken in jo izvedemo s potopitvijo polimernih nanovlaken v raztopino učinkovine. Zadnja možnost je kemijska vezava učinkovine, pri kateri mora priti do encimske ali okoljske cepitve kovalentne vezi, da se učinkovina lahko sprost iz nanovlaken (28, 38). Izboljšana terapevtska učinkovitost, zmanjšana toksičnost zaradi kontrolirane dostave učinkovine direktno na mesto delovanja ter vgradnja ene ali več učinkovin hkrati v enoslojna ali večslojna vlakna, so ključne prednosti nanovlaken kot dostavnega sistema za zdravilne učinkovine (4, 31, 32).

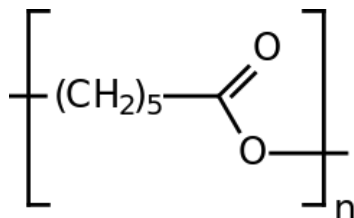
1.4.4 DOLOČANJE LASTNOSTI NANOVLAKEN

Za določanje morfologije nanovlaken, ki je odvisna od številnih parametrov, ki so vključeni v elektrostatsko sukanje, se uporabljajo različne metode. Poleg mikroskopa na atomsko silo (AFM), transmisijskega elektronskega mikroskopa (TEM) se pogosto za določanje premera vlaken, velikosti por, orientacije vlaken uporablja vrstični elektronski mikroskop (SEM), ki smo ga uporabili tudi sami (27). Interakcije med polimernimi verigami in učinkovino se lahko ovrednoti z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR), z nuklearno magnetno resonanco (NMR) ter z rentgensko praškovno difrakcijo (25, 27).

1.5 POLIKAPROLAKTON

Polikaprolakton (PCL) (Slika 7) je semikristaliničen alifatski poliester, dobro poznan po svoji počasni biorazgradnji in visoki biokompatibilnosti. Temperaturo steklastega prehoda (T_g) ima pri $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in temperaturo tališča med 59 in $64\text{ }^{\circ}\text{C}$, kar je odvisno od njegove

kristaliničnosti. Njegova povprečna molekulska masa je med 3.000 in 80.000 g/mol. Dobro topen je v organskih topilih, kot so diklorometan, kloroform in benzen. Majhno topnost ima tudi v acetonu, dimetilformamidu in acetonitrilu. V vodi je zaradi svoje hidrofobnosti netopen (44, 46).



Slika 7: Strukturna formula polikaprolaktona

Zaradi svoje zelo počasne biorazgradnje je primeren za izdelavo dostavnih sistemov s podaljšanim sproščanjem. Razgradnja traja 2 do 4 leta in poteka preko dveh faz. V prvi fazi gre za hidrolitično cepitev estrske vezi, v drugi fazi pa sledi znotrajcelična razgradnja na netoksične metabolite, ki se iz telesa izločijo direktno ali po metabolni spremembi v Krebsovem ciklu (6-hidroksikaprojska kislina) (44, 45). Za razliko od večine drugih biorazgradljivih poliestrov, PCL lokalno ne zniža pH v območju njegove razgradnje (45).

PCL ima zelo razširjeno uporabo zaradi svoje biokompatibilnosti, neimunogenosti in netoksičnosti. Edino težavo povzroča njegova hidrofobnost, kar rešujejo tudi s tem, da ga združujejo z drugimi naravnimi (hitosan, kolagen, elastin, želatin) ali sintetičnimi polimeri in na ta način izboljšajo njegove mehanske lastnosti in biokompatibilnost (47).

Ugotovili so tudi, da vgradnja MTZ v PCL nanovlakna izboljša njegovo hidrofilitnost. K temu pripomore hidroksilna skupina in polaren imidazolni obroč na molekuli MTZ (25).

PCL je bil že večkrat uspešno uporabljen za izdelavo nanovlaken. Choi in sodelavci so med prvimi izdelali PCL/kolagen nanovlakna za celično regeneracijo skeletnih mišic. Dobro se je izkazal tudi kot kostni nadomestek, kar so proučevali Porter in sodelavci. Zamani in sodelavci so v PCL nanovlakna uspešno vgradili metronidazol benzoat, katerega sproščanje je sledilo Fickovi difuziji (46).

Na naši katedri so bila že uspešno izdelana nanovlakna iz PCL, v katera so vgradili v vodi slabo topne učinkovine, kot so resveratrol (35), karvedilol in ibuprofen (34), in jim na ta način omogočili podaljšano sproščanje iz dostavne oblike. Z namenom zdravljenja parodontalne bolezni so Zupančič in sodelavci izdelali PCL nanovlakna z vgrajenim resveratrolom, ki izkazuje antioksidativno delovanje (35).

2 NAMEN DELA

Parodontalna bolezen prizadene veliko ljudi, a v določenih primerih zdravljenje ni učinkovito. Naš namen dela je bil razviti nov lokalni dostavni sistem z vgrajeno protimikrobno učinkovino, s katerim bi dosegli boljšo terapevtsko učinkovitost in zmanjšali posredne neželene učinke zdravila. Odločili smo se za razvoj PCL nanovlaken z vgrajenim MTZ, ki bi jih lahko zaradi majhnega volumna enostavno vstavili v obzobni žep in tam sproščali MTZ nad MIC skozi daljši čas.

Razvoj in izdelava bosta potekala po naslednjih stopnjah:

1. Za izdelavo polimernih nanovlaken bomo uporabili metodo elektrostatskega sukanja, ki zahteva homogeno disperzijo. Zato si moramo najprej izbrati primerno topilo oz. zmes topil, v katerem bo topen tako naš hidrofoben polimer kot tudi hidrofilna učinkovina. Za uspešno elektrostatsko sukanje je poleg hlapnosti topila pomembna tudi dielektrična konstanta, ki mora biti zadostna, da sploh pride do nastanka curka in nato nanovlaken.
2. Primarno bomo izdelali prazna PCL nanovlakna in pri tem določili procesne parametre (napetost, pretok ter razdaljo med iglo in zbiralom) in parametre raztopine (koncentracija polimera in prevodnost), da bodo nastajala okrogla nanovlakna z gladko površino in brez vozlov, kar bomo določili s slikanjem z elektronskim vrstičnim mikroskopom (SEM).
3. Nato bomo v raztopino polimera in topila dodali različne koncentracije MTZ in pri predhodno postavljenih pogojih izdelali nanovlakna z vgrajeno učinkovino.
4. V literaturi je bila največkrat uspešno uporabljena metoda detekcije MTZ UV-VIS spektroskopija, zato bo ta tudi naša prva izbira. Umeritvena krivulja za MTZ bo služila za spremljanje sproščanja učinkovine.
5. Preizkušali bomo različne metode sproščanja učinkovine iz nanovlaken: v erlenmajerici, v napravi za sproščanje z vesli (Erweka) ter v Franzovi celici.
6. Z variacijami sestave in postopka bomo poskušali izdelati nanovlakna, ki bodo podaljšano sproščala MTZ.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Polimer za izdelavo nanovlaken

- Polikaprolakton $M_w = 70\,000 - 90\,000$ g/mol (Sigma Aldrich, ZDA)

Topila za pripravo polimernih raztopin, ki ustrezajo Ph. Eur.

- Kloroform (Merck, Nemčija)
- Aceton (Merck, Nemčija)
- Diklorometan (Merck, Nemčija)
- N,N – dimetilformamid (Sigma Aldrich, Nemčija)

Sredstvo za dvig prevodnosti polimernim raztopinam

- Kalijev jodid (Merck, Nemčija)

Površinsko aktivna snov za izboljšanje vgradnje učinkovine

- Span80 (Merck, Nemčija)

Snovi za pripravo fosfatnega pufra

- Kalijev dihidrogenfosfat $M_w = 136,08$ g/mol (Merck, Nemčija)
- Natrijev hidroksid $M_w = 40,00$ g/mol (Merck, Nemčija)
- Destilirana voda (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija)

Učinkovina za vgrajevanje v nanovlakna

- Metronidazol $M_w = 171,15$ g/mol (Sigma Aldrich, Nemčija)

3.2 NAPRAVE

- analitska tehtnica (XS205 Dual Range, Mettler Toledo, ZDA)
- pH-meter (SevenCompact, Mettler Toledo, ZDA) z elektrodo (InLab[®] Expert Pro-ISM pH, Mettler Toledo, ZDA)
- ultrazvočna kadička (Sonis 4, Iskra PIO d.o.o., Slovenija)
- magnetno mešalo (IKA[®] RCT basic safety control in IKA[®] – WERKE RO15 power, Nemčija)
- mešalo Ultra Turrax (IKA T25 digital Ultra-Turrax[®], Nemčija)
- elektroda za merjenje prevodnosti (Mettler Toledo InLab730 Conductivity, ZDA)

- vrstični elektronski mikroskop (SEM) (Supra 35 VP, Carl Zeiss, Švica)
- napravo za elektrostatsko sukanje sestavljajo:
 - generator visoke električne napetosti (HVG-P60-R-EU, Linari Engineering, Italija)
 - črpalka (R-99E, RazelTM, Italija)
 - kovinska igla z notranjim premerom 0,8 mm (Linari Engineering, Italija)
 - zbiralo, ovito v aluminijasto folijo
 - električni kabel za dovod el. napetosti in za ozemljitev zbirala
- UV/VIS spektrofotometer (HEWLETT PACKARD 8453, Agilent Technologies, ZDA)

3.3 IZDELAVA NANOVLAKEN

3.3.1 Priprava raztopin polimera in učinkovine

10 % (m/m) PCL raztopine smo pripravili tako, da smo PCL natehtali v erlenmajerico z brusom in nato dodali preračunane mase topil. V erlenmajerico smo dodali še magnetno mešalce in jo pokrili z zamaškom, da smo preprečili izhlapevanje topil. Raztopina se je na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi mešala čez noč.

Učinkovino smo na analitski tehnici natehtali v stekleno epruveto in nato dodali določeno maso polimerne raztopine. Pri tehtanju ter rokovanju z MTZ smo uporabili zaščitno masko za nos in usta, saj učinkovina izkazuje potencialno kancerogeno delovanje (18). Raztopino polimera ter dodano učinkovino smo pustili mešati 10 minut na Ultra turrax-u pri hitrosti 10000 rpm, da se je učinkovina popolnoma raztopila.

3.3.2 Merjenje prevodnosti raztopin

Sveže pripravljenim raztopinam polimera in učinkovine smo izmerili prevodnost z elektrodo za merjenje prevodnosti v organskih topilih. V epruveto s polimerno raztopino smo potopili elektrodo in pri tem pazili, da vmes ni prišel mehurček zraka, ki bi motil meritev. Vsako meritev smo opravili trikrat in nato izračunali povprečno vrednost za prevodnost pri določeni temperaturi. Pomembno je, da je temperatura raztopin enaka, saj je prevodnost tudi temperaturno odvisna. Elektrodo smo očistili z acetonom, v katerem je PCL dobro topen.

3.3.3 Elektrostatsko sukanje

V 20 mL plastično brizgo smo natočili 5-10 mL polimerne raztopine na način, da ni bilo prisotnih zračnih mehurčkov. Na brizgo smo privili kovinsko iglo z notranjim premerom 0,8 mm in ju skupaj postavili na črpalko ter nastavili želen pretok raztopine skozi iglo. Na iglo smo pritrdili kabel za dovod visoke električne napetosti iz generatorja. Zbiralo smo ovili v aluminijasto folijo in ga postavili na želeno razdaljo (15-20 cm) od konca igle ter nanj priključili kabel, ki je zbiralo ozemljil. Pred vklopom generatorja smo obrisali še kapljico na koncu igle, nato pa nastavili želeno napetost (12-20 kV) ter generator vklopili. Če se je na konici igle nabrala kapljica, ki bi lahko motila proces elektrostatskega sukanja, smo generator izklopili, počakali, da je padla napetost pod ustrezno mejo in obrisali konico igle. Proces elektrostatskega sukanja je potekal pri normalnih pogojih, ki so bili v prostoru, to je ($T=25^{\circ}\text{C}$ in $\text{RH}=30\%$). Zaradi večje varnosti ob uporabi organskih topil, smo elektrostatsko sukanje izvajali v digestoriju (Slika 8).



Slika 8: Naprava za elektrostatsko sukanje; na levi strani imamo mehansko črpalko z brizgo ter kovinsko zbiralo, na desni strani pa generator visoke napetosti.

V literaturi (11) so za elektrostatsko sukanje uporabili napetosti od 14 do 17 kV. Začeli smo pri napetosti 20 kV in nato postopoma zniževali do 12 kV. Pri posameznih napetostih smo spreminjali pretok in iskali najboljše pogoje za enakomernost polimernega curka. V Tabela 1 so zbrani vsi pripravljene vzorci z njihovo sestavo in optimiziranimi pogoji elektrostatskega sukanja, pri katerih so nastajala nanovlakna.

Tabela 1: Pregled vseh vzorcev in njihove lastnosti

Polimer	Konc. PCL [%]	Topilo	Dodatki	Konc. MTZ [%]	Napetost [kV]	Pretok [mL/h]	Razdalja [cm]
PCL	10	Kloroform:acetona (3:1)	/	0	12	1,981	15
	10	Kloroform:acetona (3:1)	/	5	12	1,981	15
	10	DCM:DMF (3:2)	/	0	12	1,981	15
	10	DCM:DMF (3:2)	/	0	12	1,981	20
	10	DCM:DMF (3:2)	0,03 % KI	0	14	1,769	15
	10	DCM:DMF (3:2)	0,03 % KI	0	17	1,981	15
	10	DCM:DMF (3:2)	0,03 % KI	0	18	1,910	15
	10	DCM:DMF (3:2)	5% Span80	0	12	1,981	20
	10	DCM:DMF (3:2)	5% Span80	5	12	1,981	20
	15	DCM:DMF (3:2)	/	0	12	2,122	20
	15	DCM:DMF (3:2)	/	1	12	2,122	20
	15	DCM:DMF (3:2)	/	5	12	1,981	20
	10	DCM:DMF (3:2)	/	1	12	1,981	20
	10	DCM:DMF (3:2)	/	5	12	1,981	20
	10	DCM:DMF (3:2)	/	10	12	1,981	20
	10	DCM:DMF (3:2)	/	20	12	1,981	20

3.3.4 Vrednotenje morfologije z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Izbrane vzorce nanovlaken smo si ogledali s SEM. Vzorčke za snemanje smo pripravili tako, da smo iz folije z nanovlakni izrezali majhen kvadrata (približno 0,5 x 0,5 cm) ter ga s pomočjo prevodnega obojestranskega lepilnega traku pritrdili na nosilec za SEM slikanje. Na foliji z nanovlakni smo izbrali tako področje, kjer je bilo ravno toliko nanovlaken, da so rahlo prekrila barvo folije in jih hkrati ni bilo preveč. SEM slike smo analizirali z računalniškim programom ImageJ. Izbrali smo 30 nanovlaken iz vsakega vzorca in izračunali njihov povprečni premer.

3.3.5 Določanje nabrekanja PCL nanovlaken in izguba mase

Izrezali smo dva približno enaka kvadrata praznih PCL nanovlaken, ju stehtali ter dali sušiti na 40 °C do konstantne mase. V dve petrijevki smo natočili PBS pufer s pH 6,8 ter namočili naša nanovlakna. Po eni uri smo jih vzeli ven, osušili s filter papirjem ter ponovno stehtali. Ta postopek smo ponovili še nekajkrat in nato iz dobljenih rezultatov izračunali stopnjo nabrekanja PCL nanovlaken in izgubo mase po enačbi (38):

$$\text{Stopnja nabrekanja (\%)} = \frac{M - M_d}{M_d} * 100$$

$$\text{Izguba mase (\%)} = \frac{M_i - M_d}{M_i} * 100$$

M_i ... začetna masa nanovlaken

M_d ... masa suhih nanovlaken, posušenih do konstantne mase pri 40°C

M ... masa nanovlaken po nabrekanju, osušenih s filter papirjem

3.4 RAZVOJ ANALITSKE METODE ZA KVANTITATIVNO DOLOČANJE MTZ

3.4.1 Priprava fosfatnega pufera

Po farmakopejskem predpisu (Ph. Eur. 8.0, 2.9.3 Dissolution test for solid dosage forms, str. 274) smo pripravili PBS pufer s pH 6,8. V prvi bučki smo pripravili 250 mL 0,2 M KH_2PO_4 , v drugi bučki pa 0,2 M NaOH. Nato smo v prvo bučko z raztopino KH_2PO_4 postopoma dodajali 0,2 M NaOH in pri tem merili pH raztopine. Ko smo dosegli pH = 6,8,

smo 1000 mL bučko dopolnili do oznake z destilirano vodo in tako dobili zelen PBS pufer, ki se dobro približa dejanskemu pH sline v ustni votlini, ki znaša 6,2-7,4 (48).

3.4.2 Umeritvena krivulja za MTZ

Pripravili smo osnovno raztopino MTZ ($m=100$ mg v 100 mL pufra PBS). Da se je učinkovina popolnoma raztopila, smo jo v ultrazvočni kadički sonicirali eno minuto. Z redčenjem osnovne raztopine MTZ smo pripravili raztopine MTZ v različnih koncentracijah: 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 14 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 24 $\mu\text{g/mL}$ in 30 $\mu\text{g/mL}$, in jih uporabili kot standarde za izdelavo umeritvene krivulje z UV-VIS spektrofotometrom.

Ugotovili smo, da ima MTZ absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 320 nm. Vsem pripravljenim standardom smo tako izmerili absorbanco pri valovni dolžini 320 nm in dobili umeritveno krivuljo za MTZ.

3.4.3 Določanje specifičnosti UV-VIS metode za določitev MTZ

Izdelali smo prazna PCL nanovlakna, ki smo jih potopili v pufer PBS. V 12-ih dneh smo z UV/VIS spektrofotometrom trikrat izmerili absorbanco raztopine, v kateri so bila prazna PCL nanovlakna. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 320 nm, kjer je bil ugotovljen maksimum absorbanco za MTZ. Slepa proba je bil PBS pufer.

3.5 DOLOČANJE STABILNOST MTZ V FOSFATNEM PUFRU

Stabilnost MTZ v fosfatnem pufri s pH 6,8 smo preizkušali tako, da smo tretji in deveti dan po pripravi standardov za izdelavo umeritvene krivulje za MTZ standardom še enkrat izmerili absorbanco pri valovni dolžini 320 nm. Vse vzorce smo pred tem filtrirali preko filtra Sastorius RC 0,45 μm .

3.6 DOLOČANJE SPROŠČANJA

3.6.1 V napravi za raztapljanje z vesli

Izrezali smo tri vzorčke nanovlaken v obliki kvadrata (4 cm x 4 cm) in jih stekali na analitski tehtnici. Nanovlakna smo dali v košarice, katere smo položili na dno posod za sproščanje. Za sproščanje smo uporabili napravo za raztapljanje z vesli (2.9.3. Dissolution

test for solid dosage forms, Ph.Eur), ki je sestavljena iz posode, v katero smo nalili 600 mL fosfatnega pufra s pH 6,8, vesla, ki smo ga namestili 4 cm nad dnom posode, ter pokrova, ki preprečuje izhlapevanje medija (Slika 9). Posode se nahajajo v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C. Vesla se vrtijo s hitrostjo 50 rpm. V določenih časovnih intervalih smo jemali 10 ml vzorce, ki smo jih prefiltrirali skozi filter (Sastorius RC 0,45 µm) in jim izmerili absorbance. Odvzetega medija nismo nadomeščali s svežim pufrom. Iz umeritvene krivulje MTZ smo lahko preračunali sproščeno količino učinkovine v določenih časovnih intervalih in narisali profil sproščanja.



Slika 9: Naprava za raztapljanje z vesli (Erweka)

3.6.2 Sproščanje v erlenmajerici

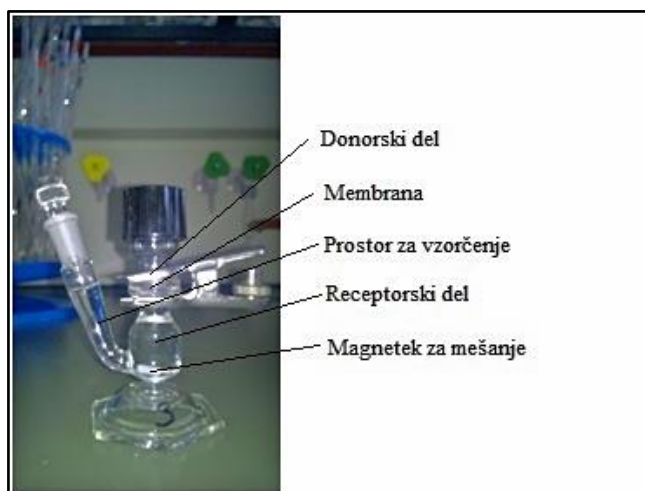
V erlenmajerice smo natočili 200 mL fosfatnega pufra s pH=6,8 in jih položili v vodno kopel, da se je medij segrel na 37 °C. Izrezali smo tri vzorčke nanovlaken v obliki kvadrata (4 cm x 4 cm), jih stehali na analitski tehtnici in jih nato previdno ovili okrog steklenih palčk. Palčke z ovitimi nanovlakni smo položili v erlenmajerice, dodali še magnet za mešanje, pokrili erlenmajerice s parafilmom ter pustili sproščati. Ven smo jemali po 1 mL vzorca in merili absorbance. Odvzet volumen smo nadomeščali s fosfatnim pufrom.

3.6.3 Sproščanje v Franzovi celici

Franzova difuzijska celica je sestavljena iz donorskega, receptorskega dela ter membrane, ki ju ločuje (Slika 10). V donorskem delu imamo učinkovino, vgrajeno v dostavni sistem ali raztopljeno v določenem puftru. Receptorski del je napolnjen z medijem, v katerega sproščamo našo učinkovino. Poleg tega se v receptorskem delu nahaja tudi magnetno

mešalce za mešanje. Za membrano se lahko uporabi različne polimerne, filtrske in tudi naravne membrane, odvisno od namena uporabe. Za difuzijo hidrofilnih molekul se običajno uporabljajo hidrofilne membrane (membrane iz celuloznih estrov ali regenerirane celuloze) (49). Pri nas smo uporabili celuloza-acetatni filter z velikostjo por 0,45 μm .

V našem primeru smo v receptorski del Franzove celice natočili 8 mL fosfatnega pufra in na stik med donorskim in receptorskim delom položili filter papir, ki je služil kot membrana. Pri tem smo pazili, da ni prišel vmes zračni mehurček, ki bi onemogočil stik z medijem. V spodnji del smo dodali majhen magnetek ter sestavili še preostale dele. Franzove celice smo položili v vodno kopel, da se je medij segrel na 37 °C. Na membrano v donorskem predelu smo nato položili natehtani vzorec nanovlaken in dodali še 0,5 mL fosfatnega pufra. Ven smo jemali 800 μL vzorce, ki smo jih nadomeščali s fosfatnim pufrom. Vzorcem smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 320 nm in s pomočjo umeritvene krivulje določili profil sproščanja MTZ kot kumulativno količino sproščene učinkovine glede na čas.



Slika 10: Franzova celica in njeni sestavni deli

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRIPRAVA NANOVLAKEN

Izbor ustreznega topila je izjemno pomemben pri pripravi raztopin za elektrostatsko sukanje. Osnovne zahteve topila ali zmesi topil so zadostna topnost tako polimera kot učinkovine v danem topilu oz. zmesi topil, da dobimo homogeno disperzijo, ki mora imeti tudi ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti za elektrostatsko sukanje. V našem primeru imamo hidrofoben PCL in hidrofilen MTZ, kar nam dodatno otežuje izbor ustreznega topila. V spodnji Tabela 2 so predstavljene topnosti PCL in MTZ v posameznih topilih. Da bi dosegli kar najboljšo topnost obeh in možnost nastanka nanovlaken smo preizkušali več različnih kombinacij topil in dodatkov. Preučevali smo, kakšen vpliv ima izbor topil, dodatek soli in dodatek površinsko aktivne snovi (PAS) na topnost PCL in MTZ ter nato na nastanek nanovlaken.

Tabela 2: Fizikalno-kemijske lastnosti uporabljenih topil ter topnost PCL in MTZ v njih (28, 47, 51)

Topilo	Formula	MW [g/mol]	T_{vr} [°C]	T_t [°C]	η [mPas] (20°C)	ϵ (20°C)	σ [μ S/cm]	Topnost PCL	Topnost MTZ [g/100 mL]
Voda	H ₂ O	18	100	0	1,0	79,7	5×10^{-2}	netopen	0,95
Aceton	C ₃ H ₆ O	58	56	- 95	0,4	20,6	5×10^{-3}	delno topen	0,5
Kloroform	CHCl ₃	119	61	- 23	0,6	4,8	$<1 \times 10^{-4}$	delno do dobro topen	0,4
DMF	C ₃ H ₇ NO	73	153	- 61	0,9	36,7	6×10^{-2}	slabše topen	10*
DCM	CH ₂ Cl ₂	84,93	40	- 97	0,4	8,93 (25°C)	/	delno do dobro topen	0,32*

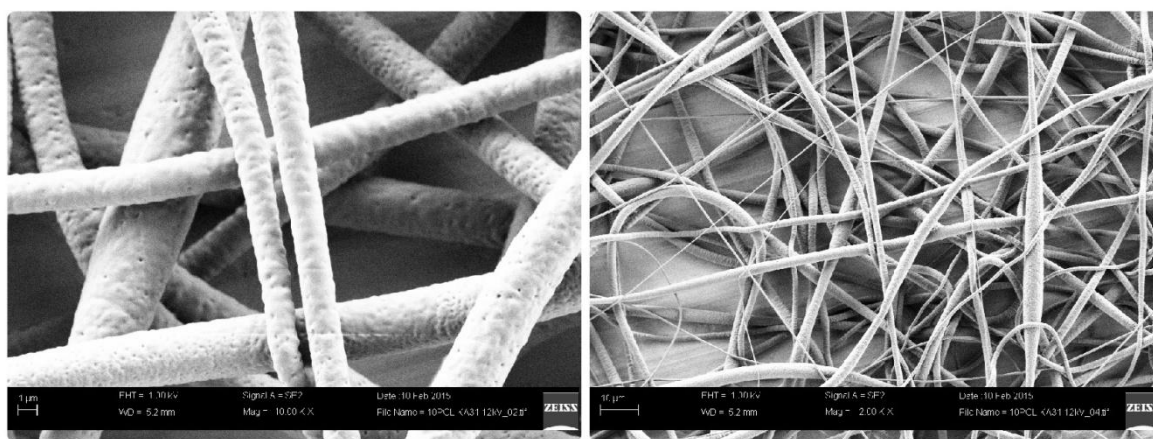
* eksperimentalno določena topnost MTZ v topilu

4.1.1 Priprava in vrednotenje nanovlaken pripravljenih iz zmesi kloroforma in acetona

Kot topilo smo najprej uporabili zmes kloroforma in acetona v razmerju 3:1, ki je že bila uspešno uporabljena za izdelavo nanovlaken iz PCL (34, 35). Pripravljenim PCL

raztopinam smo iskali najustreznejše pogoje za elektrostatsko sukanje, tako da smo pri posameznih napetostih spreminjali pretok in opazovali nastajanje nanovlaken.

Pri elektrostatskem sukanju 10 % raztopine PCL v kloroformu in acetonu v razmerju 3:1 (m/m) smo pri napetosti 12 kV in pretoku 1,981 mL/h dosegli nastanek Taylorjevega stožca na koncu igle, vendar je bilo sukanje še vedno precej neenakomerno in so vmes postopoma nastajale tudi kapljice, ki so motile proces sukanja. Zmes kloroforma in acetona ima zelo nizko prevodnost, kar lahko vodi zaradi manjšega delovanja nateznih sil pri prehodu polimerne raztopine skozi električno polje do nastanka vozlastih nanovlaken. Morfologijo izdelanih nanovlaken smo ocenili na posnetkih SEM. Kot vidimo na Slika 11 imajo nastala nanovlakna porozno, rahlo nagubano površino. Njihova oblika je okrogla, kar kaže na to, da je bila uporabljena razdalja pri elektrostatskem sukanju ustrezna (15 cm). Nanovlakna so imela povprečni premer 2410 ± 658 nm.

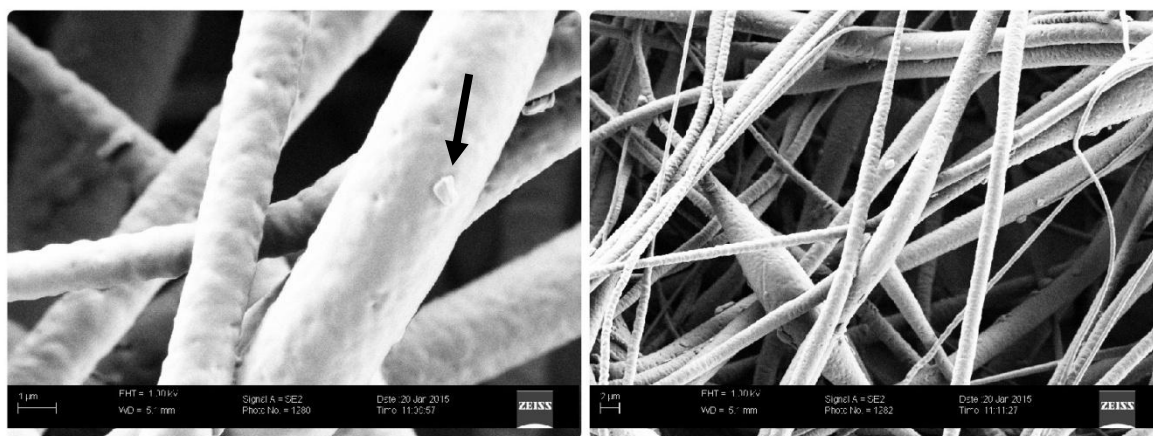


Slika 11: Prazna nanovlakna, izdelana iz 10 % raztopine PCL v kloroformu in acetonu, pri 10.000-kratni (levo) in 2.000-kratni (desno) povečavi.

10 % raztopini PCL v kloroformu in acetonu (3:1) smo nato dodali 0,03 % KI in na ta način povečali prevodnost raztopine. V literaturi (25) so z dodatkom soli preprečili nastanek vozlaste morfologije nanovlaken, ki se lahko pojavi pri uporabi acetona kot topila. Pri napetosti 15 kV in pretoku 1,910 mL/h smo sicer dosegli nastanek stožca na koncu igle, vendar se je ta kmalu preoblikoval v kapljico, kar je vodilo v nastajanje zelo neenakomernih nanovlaken z vmesnimi kapljicami. Posledično smo se odločili, da za pripravo nanovlaken uporabimo PCL raztopino brez dodatka soli.

V nadaljevanju smo v nanovlakna vgrajevali MTZ. Nanovlakna iz 10 % PCL raztopine v kloroformu in acetonu (3:1) z dodatkom 5 % MTZ so nastajala pri enakih pogojih kot pri

praznih nanovlaknih, in sicer pri napetosti 12 kV in pretoku 1,981 mL/h. Na Slika 12 je razvidna morfologija nanovlaken. Že pri vgradnji 5% MTZ imamo lahko vidimo na površini nanovlaken drobne pikice, ki predstavljajo izkristalizirano učinkovino. Nanovlakna so malenkost bolj gladka v primerjavi z nanovlakni brez učinkovine, vendar lahko opazimo pri manjši povečavi tudi vozle. Nanovlakna so imela povprečni premer 1403 ± 418 nm in so bila tanjša kot nanovlakna brez učinkovine.



Slika 12: Nanovlakna iz 10 % PCL raztopine v kloroformu in acetonu (3:1) z vgrajenimi 5 % MTZ.

Ko smo želeli v nanovlakna vgraditi večjo količino učinkovine smo ugotovili, da je topnost MTZ v kloroformu in acetonu precej majhna, saj smo že pri 10 % MTZ presegli njegovo topnost v tej zmesi topil. V raztopini so ostali kristalčki učinkovine, ki se niso raztopili niti po 10-minutnem mešanju na ultra turrax-u. Ker se učinkovina ni popolnoma raztopila in smo posledično dobili nanovlakna z ostanki učinkovine na njihovi površini, se predvideva, da bi to lahko povzročilo njeno takojšnje sproščanje. Tega pa si ne želimo, zato smo morali izbrati novo zmes topil.

4.1.2 Priprava in vrednotenje nanovlaken pripravljenih iz zmesi diklorometana in dimetilformamida

Z preizkušanjem topnosti učinkovine smo ugotovili, da je topnost MTZ v DMF veliko boljše kot v DCM. Glede na to, da je tudi PCL dobro topen smo uporabili kombinacijo teh dveh topil, ki je bila že uspešno uporabljena za izdelavo nanovlaken z elektrostatskim sukanjem (35). DCM ima zelo nizko električno prevodnost (njegova dielektrična konstanta je 9,1 pri temp. 25 °C) zaradi česar ga moramo za uspešno elektrostatsko sukanje

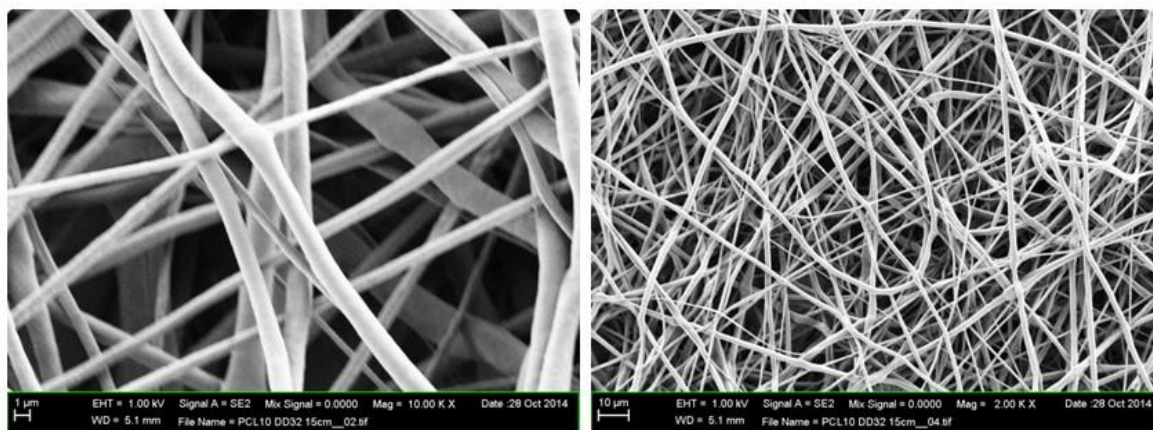
kombinirati še s kakšnim bolj prevodnim topilom, kot je npr. DMF, ki ima višjo dielektrično konstanto (36,7 pri 25 °C) (52).

Pripravili smo 10 % raztopino PCL v zmesi topil DCM:DMF = 3:2 (V/V) in iskali najustrežnejše pogoje za elektrostatsko sukanje, tako da smo pri posameznih napetostih spreminjali pretok in opazovali nastajanje nanovlaken kot je prikazano v Tabela 3. Pri napetosti 12 kV in pretoku 1,981 mL/h smo dosegli pogoje, pri katerih je na koncu igle nastajal stožec, iz katerega se je razširil tanek curek polimerne raztopine proti zbiralu.

Tabela 3: Pogoji elektrostatskega sukanja za 10 % raztopino PCL v DCM:DMF (3:2), kjer so nastajala nanovlakna

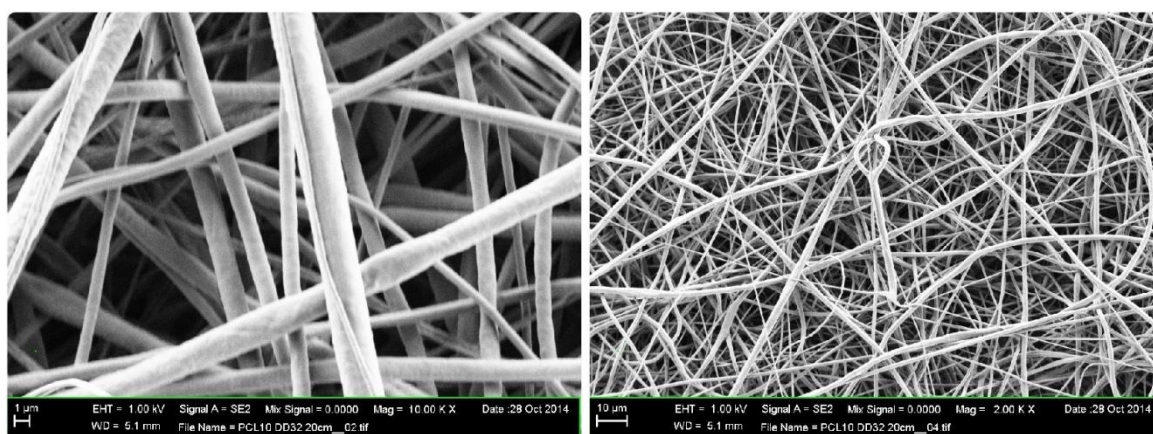
Električna napetost (kV)	Pretok (mL/h)	Nastajanje stožca na koncu igle in raztezanje	Nastanek nanovlaken
14	3,113	Imamo samo en curek, stožec ni viden	DA
12	1,981	Pravilen stožec in enakomerno nastajanje nanovlaken	DA
10	1,910	Lep stožec, enakomerno nastajanje NV	DA
8	0,707	Še vedno kaplja, pretok je prevelik	NE

Da bi ugotovili kakšna razdalja med koncem igle in zbiralom je najbolj primerna za izdelavo nanovlaken pri takšnih pogojih ($U = 12$ kV in $Q = 1,981$ mL/h), smo izdelali prazna nanovlakna pri dveh različnih razdaljah in opazovali njihovo morfologijo na SEM posnetkih. Pri nanovlaknih, ki smo jih izdelali pri razdalji 15 cm (Slika 13), opazimo, da so nekatera vlakna ploščata in se ponekod tudi spajajo med seboj. Iz tega lahko sklepamo, da je bila razdalja med koncem igle in zbiralom premajhna in topilo v času zблиžanja ni uspelo v celoti izhlapeti, nakar so se posamezna vlakna na zbiralu zlila med seboj.



Slika 13: Nanovlakna izdelana iz 10 % raztopine PCL v DCM:DMF (3:2) in razdalji 15 cm pri 10.000-kratni (levo) in 2.000-kratni (desno) povečavi.

Pri razdalji 20 cm (Slika 14) so nastala gladka in okrogla vlakna, ki se med seboj niso spajala. Čeprav so bila tudi pri tej razdalji vlakna neenakomerno debela, lahko zaključimo, da je bila razdalja 20 cm vseeno boljše izbira za izdelavo nanovlaken.



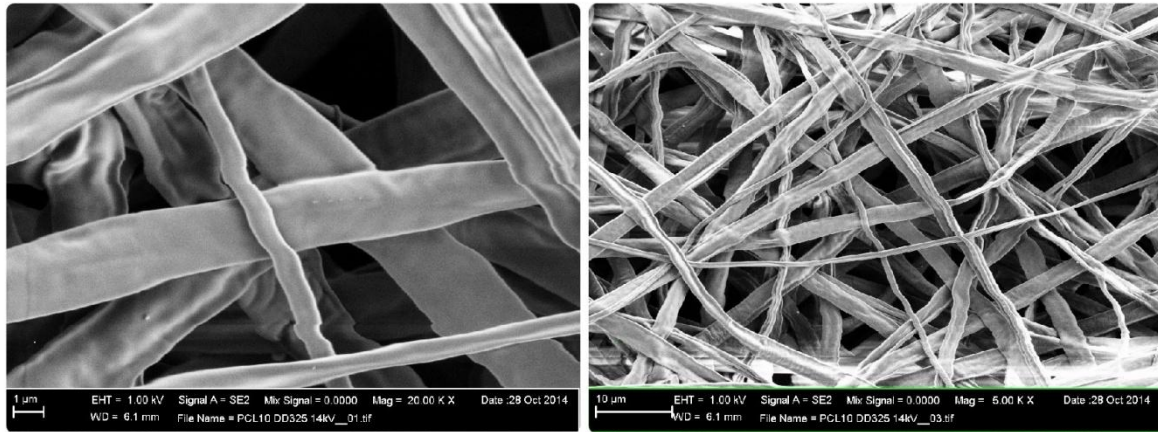
Slika 14: Nanovlakna izdelana iz 10 % raztopine PCL v DCM:DMF (3:2) in razdalji 20 cm pri 10.000-kratni (levo) in 2.000-kratni (desno) povečavi.

Nato smo pripravili še 10 % PCL raztopino v DCM:DMF (3:2 V/V) z dodatkom 0,03 % KI in posledično večjo prevodnostjo, kar bi nam lahko omogočilo nastanek tanjših nanovlaken. Zaradi večje prevodnosti raztopine smo iskanje pogojev začeli pri napetosti 20 kV in nato postopoma zniževali do 12 kV (Tabela 4). Razdalja med iglo in zbiralom je bila 20 cm. Pri večjih napetostih je bil potreben večji pretok, da smo dosegli nastanek Taylorjevega stožca iz katerega se je raztezal en sam curek. Pri prenizkih pretokih ima curek razpršeno obliko in slišimo lahko tudi rahlo prasketanje, kar kaže na to, da se curek zasušuje še pred prihodom na zbiralo. Z nižanjem električne napetosti je bil tudi pretok,

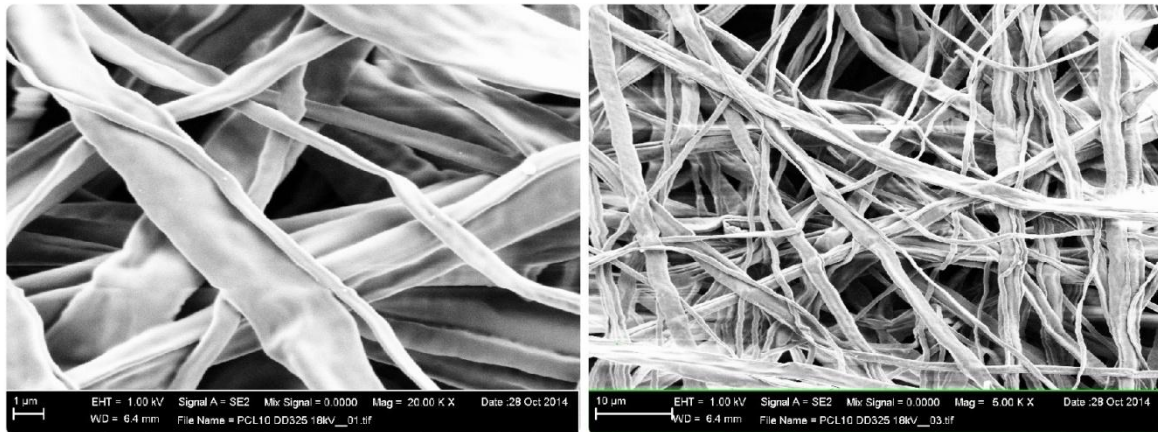
potreben za nastanek stožca, manjši. Na oko najlepša nanovlakna so uspevala pri napetosti 17 kV ter pretoku 1,981 mL/h. Pri teh pogojih je nastajal tudi stožec na koncu igle, ki pa ni bil ves čas enakomeren in so počasi nastajale tudi kapljice. Ker nas je zanimalo, kako izgledajo nanovlakna, ki niso nastajala na optimalen način, smo na SEM poleg zgoraj omenjenih opazovali tudi nanovlakna, narejena pri napetostih 18 kV ($Q=1,769$ mL/h) in 14 kV ($Q=1,910$ mL/h). Pri teh ni prišlo do nastanka stožca na koncu igle ampak smo imeli razpršenih več curkov, ki so se raztezali v različne smeri. Kot lahko opazimo so pri napetostih 14 kV (Slika 15) in 18 kV (Slika 16) in razdalji 15 cm nastala ploščata nanovlakna neenakomernih debelin, kar je lahko posledica prekratke razdalje med iglo in zbiralom pri takšni napetosti. Razlike v premeru posameznih nanovlaken so precejšnje. Nanovlakna, izdelana pri napetosti 17 kV in razdalji 15 cm (Slika 17), kjer smo dosegli nastanek Taylor-jevega stožca, izgledajo v večini lepo okrogla in gladka, takšna, kot si želimo. Njihov povprečni premer znaša 765 ± 157 nm.

Tabela 4: Pogoji elektrostatskega sukanja za 10 % raztopino PCL v DCM:DMF (3:2) z dodatkom 0,03 % KI, kjer so nastajala nanovlakna

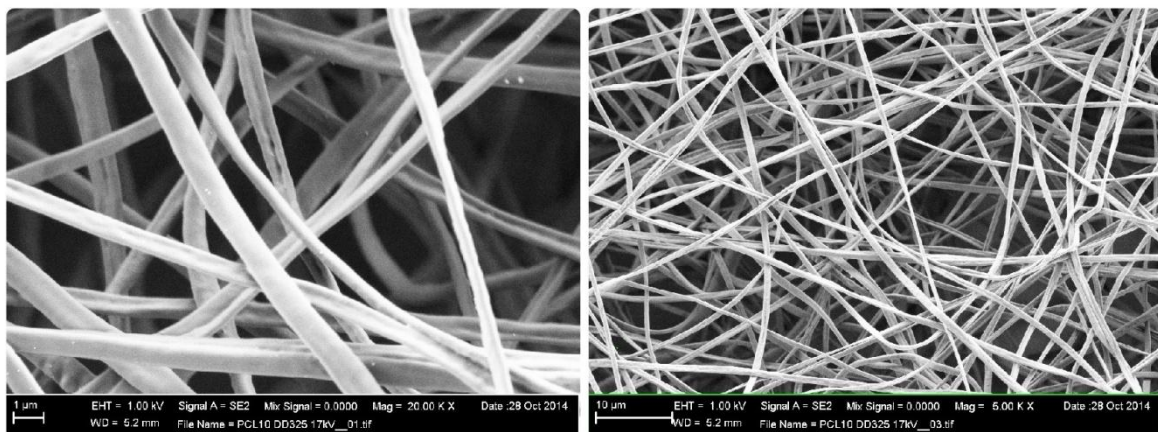
Električna napetost (kV)	Pretok (mL/h)	Nastajanje stožca na koncu igle in raztezanje	Nastanek nanovlaken
19	2,476	Stožec, sčasoma nastane kapljica	DA
18	2,264	Stožec, kmalu nastane kapljica	DA
17	1,981	Stožec, kapljica nastaja počasneje	DA
15	1,415	Nekaj časa stožec, nekaj časa razpršeno	DA
14	1,273	Pravilen stožec	DA
12	1,132	Dober približek stožca	DA



Slika 15: Nanovlakna, izdelana iz 10 % raztopine PCL z dodatkom 0,03 % KI in napetosti 14 kV pri 20.000-kratni (levo) in 5.000-kratni (desno) povečavi.



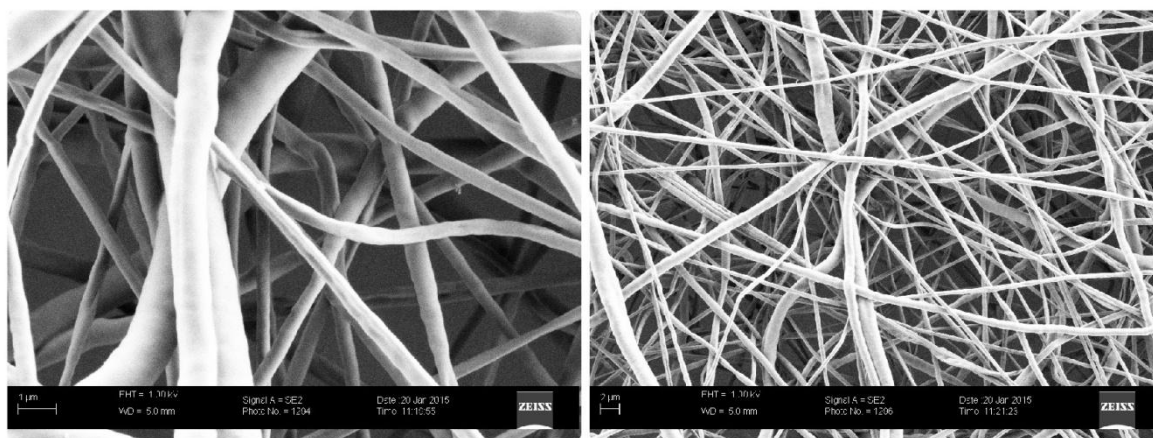
Slika 16: Nanovlakna, izdelana iz 10 % raztopine PCL z dodatkom KI in napetosti 18 kV pri 20.000-kratni (levo) in 5.000-kratni (desno) povečavi.



Slika 17: Nanovlakna, izdelana iz 10 % raztopine PCL z dodatkom KI in napetosti 17 kV pri 20.000-kratni (levo) in 5.000-kratni (desno) povečavi.

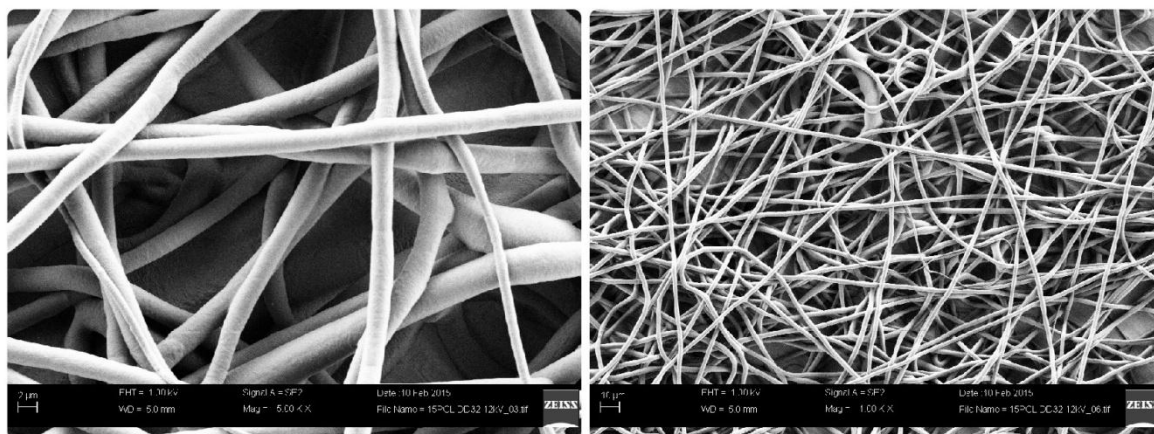
Ugotovili smo, da je nastajanje nanovlaken najbolj enakomerno in brez motečih kapljic pri 10% raztopini PCL v DCM:DMF (3:2 v/v) brez dodatka soli, kjer dobimo okrogla in gladka nanovlakna. Pogoji, pri katerih smo dosegli nastanek Taylorjevega stožca, iz katerega se je raztezal en sam curek, so bili naslednji: električna napetost 12 kV, pretok 1,981 mL/h in razdalja med koncem igle in zbiralom 20 cm. Glede na to, da je bila tudi topnost MTZ v tem topilu boljša, je bila 10 % raztopina PCL v DCM in DMF naša osnova za nadaljnje delo.

Z namenom povečanja topnosti MTZ v polimerni raztopini in posledično izboljšanjem njegove vgradnje v nanovlakna smo izdelali prazna nanovlakna iz osnovne 10 % PCL raztopine, ki smo ji dodali PAS. V polimerno raztopino smo dodali 5 % Spana 80 glede na maso polimera v raztopini in preizkušali topnost MTZ. Ugotovili smo, da se v primeru dodatka PAS topnost MTZ izboljša za približno 20 %. Elektrostatsko sukanje je potekalo pri enakih pogojih kot pri raztopinah brez dodatka PAS, čeprav je bila prevodnost teh raztopin kar 10-krat večja. Nastala vlakna (Slika 18) so v primerjavi z vlakni, kjer nismo imeli dodane PAS, manj gladka in bolj neenakomernih debelin. Njihov povprečni premer je 398 ± 90 nm.



Slika 18: Prazna nanovlakna, izdelana iz 10 % raztopine PCL v DCM IN DMF z dodatkom PAS

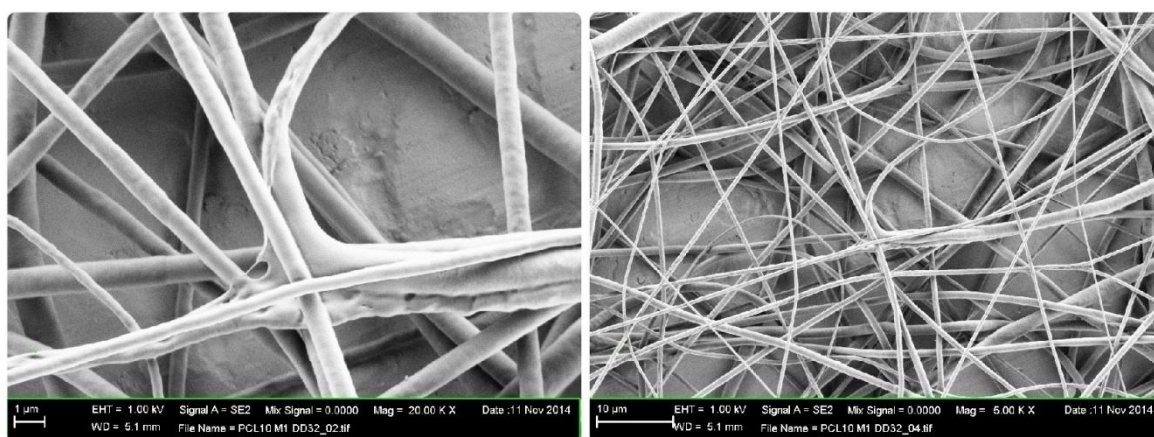
Da bi dosegli bolj zadržano sproščanje učinkovine smo poskušali narediti debelejša vlakna. Uporabili smo 15% raztopino PCL v DCM:DMF (3:2 V/V). Nastala vlakna (Slika 19) so na videz okrogla in gladka, njihov premer pa znaša 2408 ± 458 nm.



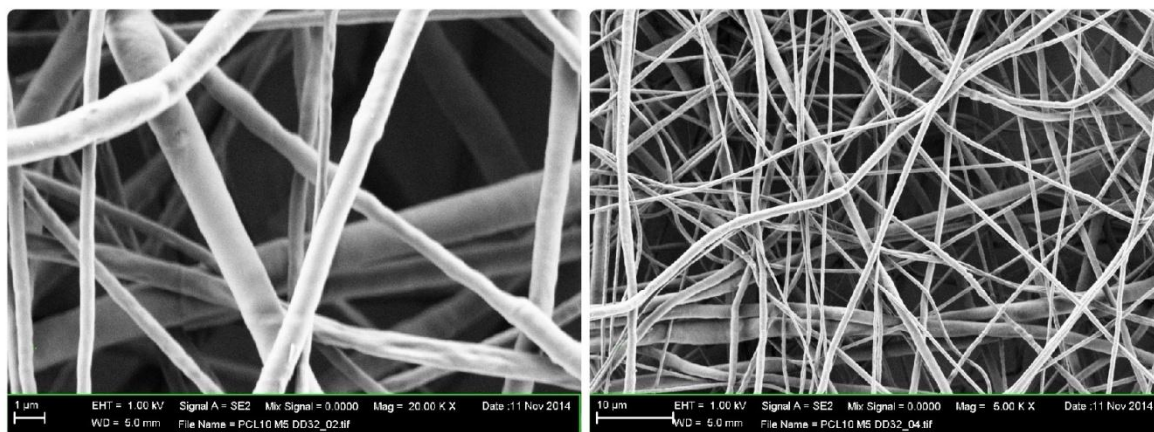
Slika 19: Nanovlakna izdelana iz 15 % raztopine PCL v DCM:DMF (3:2 v/v) pri 5.000-kratni (levo) in 1.000-kratni (desno) povečavi.

Vgradnja MTZ v PCL nanovlakna

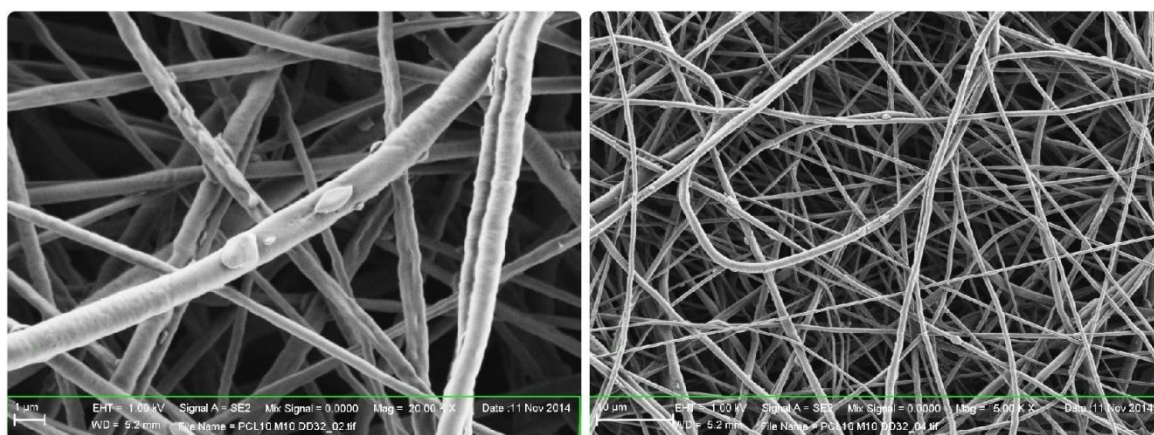
Glede na topnost PCL in MTZ v zmesi DCM:DMF (3:2 V/V) in glede na uspešno elektrostatsko sukanje praznih PCL nanovlaken pri napetosti 12 kV, pretoku 1,981 mL/h ter razdalji 20 cm, smo se odločili, da bomo v slednjo raztopino vgradili različne odstotke MTZ. Pripravili smo raztopine z 1-20 % MTZ v DCM:DMF (3:2 V/V) glede na maso PCL. Pri višjih odstotkih MTZ je bilo potrebno daljše mešanje na ultra-turrax (10 min), da se je ta popolnoma raztopil. Z njegovim dodatkom se je polimerna raztopina obarvala rahlo rumeno. Izgled nastalih nanovlaken z vgrajeno učinkovino je prikazan na slikah 20-23.



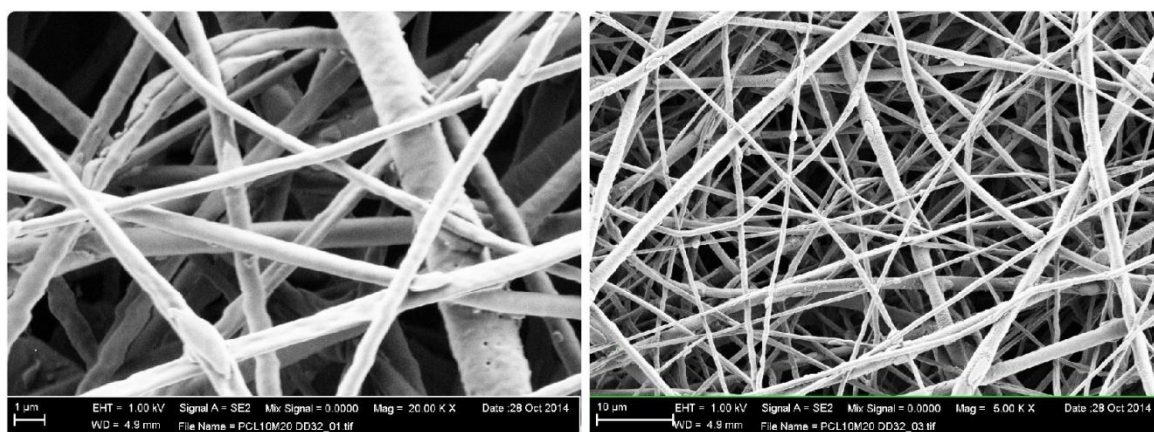
Slika 20: Nanovlakna iz 10 % raztopine PCL v DCM in DMF (3:2) z vgrajenim 1% MTZ pri 20.000-kratni (levo) in 5.000-kratni (desno) povečavi.



Slika 21: Nanovlakna iz 10 % raztopine PCL v DCM in DMF (3:2) z vgrajenimi 5 % MTZ pri 20.000-kratni (levo) in 5.000-kratni (desno) povečavi.



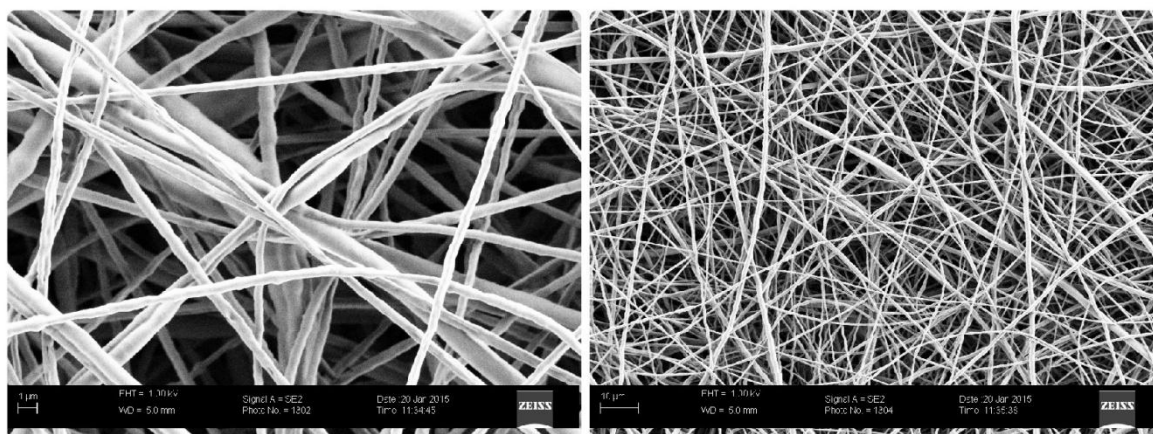
Slika 22: Nanovlakna iz 10 % raztopine PCL v DCM in DMF (3:2) z vgrajenimi 10 % MTZ pri 20.000-kratni (levo) in 5.000-kratni (desno) povečavi.



Slika 23: Nanovlakna iz 10 % raztopine PCL v DCM in DMF (3:2) z vgrajenimi 20 % MTZ pri 20.000-kratni (levo) in 5.000-kratni (desno) povečavi.

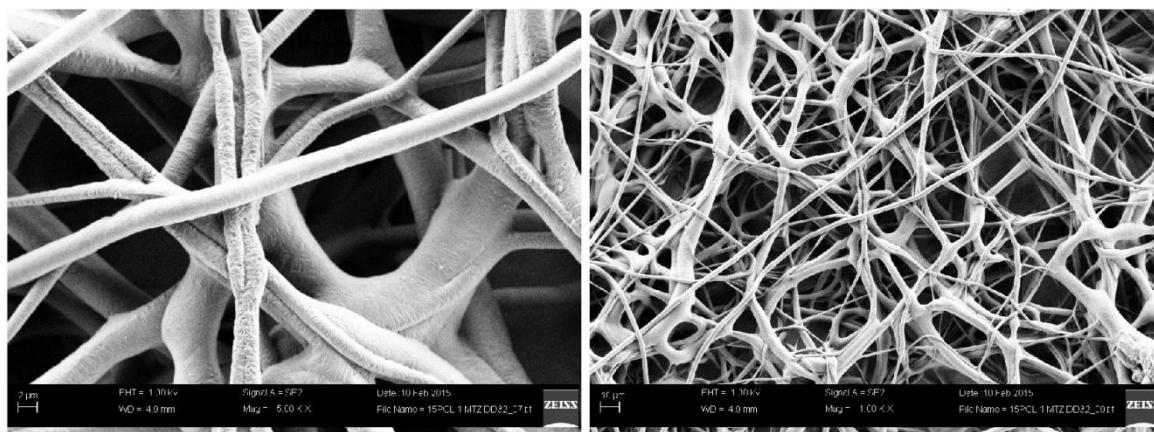
Ugotovili smo, da pri vgradnji več kot 10 % MTZ v PCL nanovlakna, pride do nastanka kristalčkov na površini. Pri nižji vgradnji se MTZ dispergira v PCL matriks na molekularni ravni in zaradi tega do nastanka kristalov ne pride. Problem nastanka nanovlaken z nedispergirano učinkovino na njihovi površini je, da se bo le-ta zelo hitro sprostila in tako onemogočila zadržano sproščanje iz naše dostavne oblike. Pri večji vgradnji učinkovine smo dobili bolj enakomerna in manjša nanovlakna kot pri nižji vgradnji.

Da bi izboljšali vgradnjo MTZ v PCL nanovlakna smo v nadaljevanju izdelali nanovlakna z dodatkom PAS, v katere smo vgradili 5 % MTZ. Izdelana nanovlakna na Slika 24 imajo grobo površino, vendar učinkovine na površini ne opazimo. V povprečju so vlakna z vgrajeno učinkovino debelejša kot prazna nanovlakna. Njihov povprečni premer znaša 496 ± 71 nm.

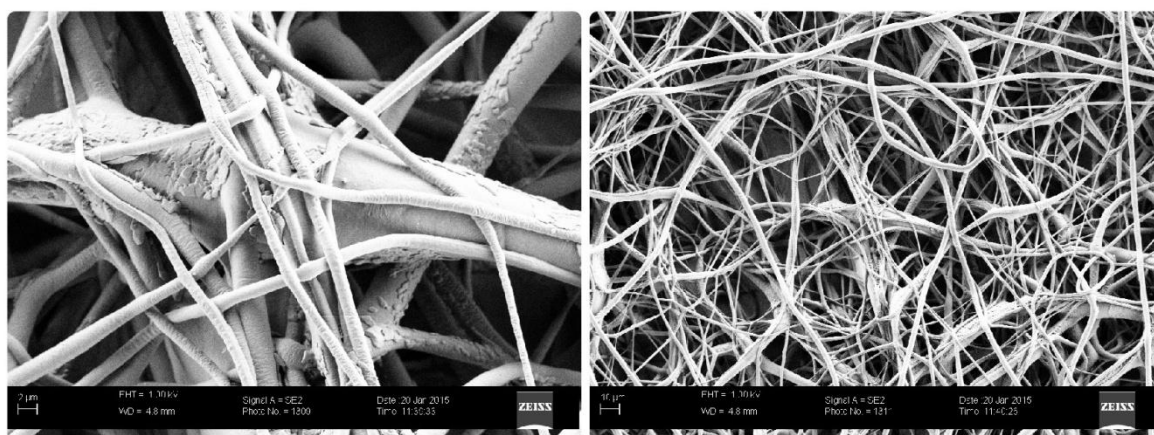


Slika 24: Nanovlakna izdelana iz 10 % raztopine PCL v DCM:DMF (3:2) z dodatkom Spana 80 in vgrajenimi 5 % MTZ.

Pri vgradnji učinkovine v nanovlakna, izdelana iz 15 % raztopine PCL v DCM:DMF (3:2 V/V), se je izgled nastalih nanovlaken popolnoma spremenil. Vlakna so se med seboj spojila, nastali so vozli, njihove velikosti so zelo različne in daleč od naših pričakovanj. Na Slika 25 vidimo izgled nanovlaken z vgrajenim 1 % MTZ. Vlakna se med seboj spajajo in tvorijo kot nekakšno mrežo. Njihova debelina se zelo razlikuje in povprečni premer znaša 2281 ± 618 nm. Slika 26 prikazuje nanovlakna z vgrajenimi 5 % MTZ. Na površini lahko opazimo delčke izkristalizirane učinkovine, ki se ni uspela vgraditi v samo strukturo nanovlaken. Premer nanovlaken je 1314 ± 152 nm.



Slika 25: Nanovlakna izdelana iz 15 % raztopine PCL v DCM:DMF (3:2 v/v) z vgrajenim 1 % MTZ pri 5.000-kratni (levo) in 1.000-kratni (desno) povečavi.



Slika 26: Nanovlakna izdelana iz 15 % raztopine PCL v DCM:DMF (3:2 v/v) z vgrajenimi 5 % MTZ.

4.1.3 VPLIV RAZLIČNIH SPREMENLJIVK NA PREMER NANOVLAKEN

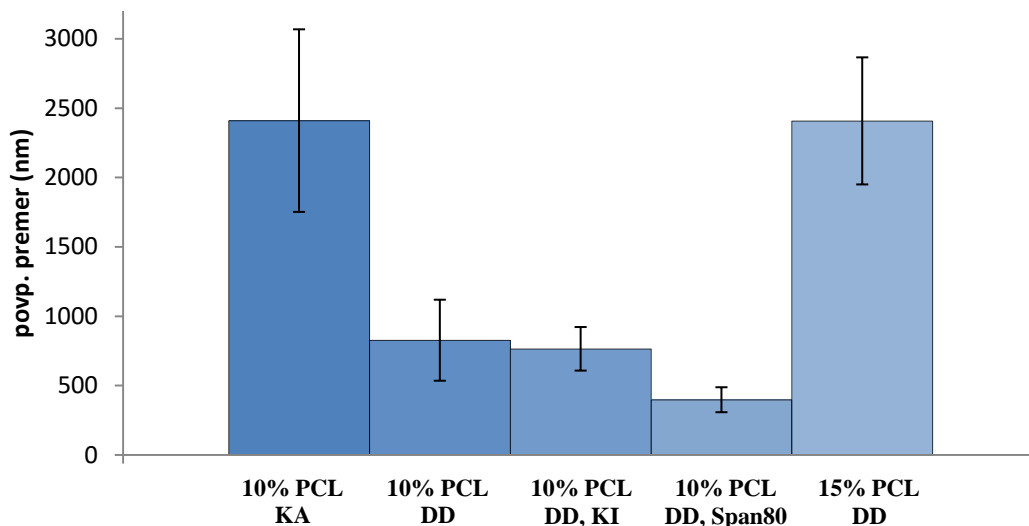
Na nastanek nanovlaken in njihov povprečni premer vplivajo številne spremenljivke. Ena od izredno pomembnih je prevodnost polimernih raztopin, iz katerih naredimo nanovlakna. Električna prevodnost je lastnost raztopin, da prevajajo električni tok, ki je ključna za elektrostatsko sukanje. Odvisna je od prisotnih ionov, njihove koncentracije, naboja ter temperature, pri kateri je bila prevodnost izmerjena. Vsem raztopinam, ki smo jih uporabljali za elektrostatsko sukanje, smo izmerili električno prevodnost in povprečen premer nanovlaken pripravljenih iz istih raztopin ter rezultate podali v Tabela 5.

Tabela 5: Sestava PCL raztopin in izmerjena prevodnost ter povprečni premeri nanovlaken

Polimer	PCL [%]	Zmes topil	Razmerje topil	MTZ [%]	Prevodnost povp. [$\mu\text{s/cm}$]	Premer nanovlaken [nm]
PCL	10	kloroform:acetone	3:1	0	$0,66 \pm 0,02$	2410 ± 658
				5	$1,19 \pm 0,02$	1316 ± 309
	10	DCM:DMF	3:2	0	$6,51 \pm 0,01$	827 ± 292
				1	$7,67 \pm 0,01$	754 ± 243
				5	$8,93 \pm 0,04$	612 ± 183
				10	$9,09 \pm 0,15$	450 ± 139
				20	$9,34 \pm 0,02$	507 ± 116
	10	DCM:DMF 0,03% KI	3:2	0	$521 \pm 0,58$	765 ± 157
	10	DCM:DMF 5% Span80	3:2	0	$75,6 \pm 0,10$	398 ± 90
				5	$74,6 \pm 0,15$	496 ± 71
	15	DCM:DMF	3:2	0	$5,14 \pm 0,02$	2408 ± 458
				1	$6,23 \pm 0,02$	2281 ± 618
				5	$6,86 \pm 0,01$	1314 ± 152

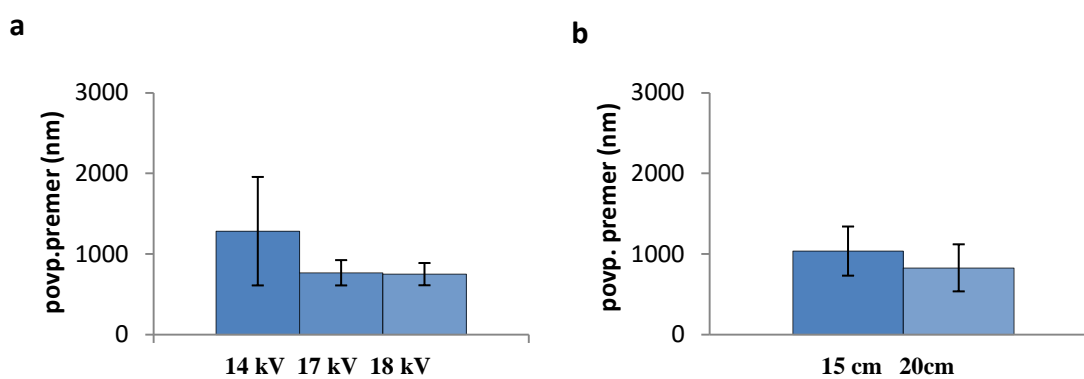
Če primerjamo 10 % raztopino PCL v kloroformu in acetone z 10 % raztopino PCL v DCM in DMF, lahko opazimo, da je prevodnost druge kar 6-krat večja, kar se odraža tudi

pri premeru nastalih nanovlaken. Z večanjem prevodnosti raztopine je na površini curka večja gostota naboja in s tem večje natezne sile pri prehodu skozi električno polje, zato nastanejo tanjša nanovlakna. Nanovlakna izdelana iz 10 % raztopine PCL v kloroformu in acetonu so imela kar 3-krat večji povprečni premer kot nanovlakna izdelana iz 10 % raztopine PCL v DCM in DMF (Slika 27). Poleg prevodnosti ima pomemben vpliv na nastanek in premer nanovlaken tudi hlapnost topil, ki je večja v primeru zmesi kloroforma in acetona. Nižje kot ima topilo temperaturo vrelišča (T_{vr}) prej izpari in suha nanovlakna nimajo več možnosti, da se tekom leta dodatno stanjšajo. Ko smo 10 % raztopini PCL v DCM in DMF dodali 0,03 % KI, se je prevodnost zaradi prisotnosti ionov kar 80-krat povečala. Premer nastalih nanovlaken pa se kljub povečanju prevodnosti raztopine v tem primeru ni zmanjšal, saj je dodatek soli zmanjšal sposobnost sukanja 10 % raztopine PCL v DCM in DMF, kar je bilo omenjeno tudi že v literaturi (35). Z dodatkom površinsko aktivne snovi smo dobili tanjša nanovlakna kot sicer. DMF močno poveča polarnost raztopine in s tem njeno prevodnost (11), saj je bila prevodnost raztopine, kjer smo dodali 5 % površinsko aktivne snovi Span 80 glede na maso polimera, kar 12-krat višja kot pri raztopini brez dodane PAS. Prevodnost 15 % raztopine PCL je bila le malo nižja v primerjavi z 10 % raztopino PCL v DCM:DMF, premer nastalih nanovlaken pa kar 3-krat večji v povprečju kot pri 10 % raztopini PCL. PCL je neelektrolit in sam ne prispeva k prevodnosti raztopine, zato imamo v primeru večje koncentracije PCL rahlo nižjo prevodnost raztopine, zaradi manjšega odstotka topil, ki pripomorejo k prevodnosti raztopine. Z večanjem koncentracije polimera pa vplivamo predvsem na viskoznost polimerne raztopine. Viskozejše raztopine se težje raztegnejo in zato dobimo debelejša nanovlakna. Tako lahko vidimo, da ne samo prevodnost, ampak tudi ostale spremenljivke raztopine, kot so hlapnost topil, koncentracija polimera, viskoznost raztopine in površinska napetost vplivajo na uspeh izdelave nanovlaken in na njihove premere.



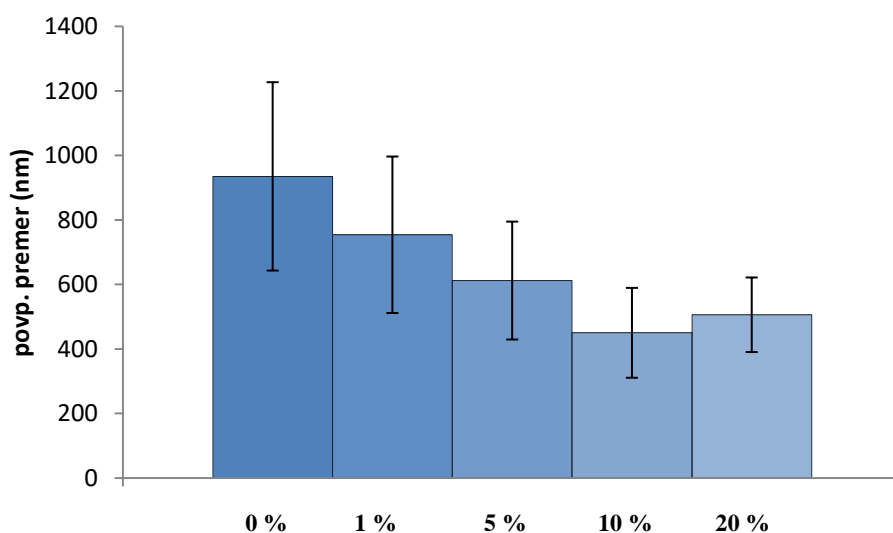
Slika 27: Povprečen premer praznih nanovlaken v odvisnosti od topila in dodanih snovi; KA - kloroform:acetone (3:1), DD - DCM:DMF(3:2)

V nadaljevanju smo primerjali vpliv dveh različnih procesnih spremenljivk na premer nastalih nanovlaken (Slika 28) iz 10% PCL raztopin v DCM in DMF. Kot vidimo na Slika 28a je višanje napetosti v določenem območju povzročilo nastanek vedno tanjših nanovlaken. Večja kot je dovedena napetost, večja je gostota električnega naboja v kapljici raztopine na koncu igle, ki povzroči v električnem polju večje natezne sile v curku, ki vodijo v nastanek tanjših nanovlaken. Prav tako je pot curka podaljšana z večanjem razdalje, ki povzroči nastanek tanjših nanovlaken (Slika 28b).



Slika 28: (a) Vpliv uporabljene napetosti in (b) razdalje med iglo in zbiralom.

Z dodajanjem MTZ se je premer nanovlaken zmanjševal (Slika 29). Do izjeme je prišlo le v primeru 20 % vgradnje učinkovine, kjer so bili premeri nanovlaken nekoliko večji, kot pri 10 % vgradnji. V literaturi razlagajo, da se z dodatkom MTZ zmanjša viskoznost raztopin, ker naj bi MTZ deloval kot plastifikator za verige PCL (11). Z zmanjšanjem viskoznosti pa dobivamo tudi vedno tanjša nanovlakna (37). Prav tako je na povprečni premer vplivala prevodnost, saj iz Tabela 5 lahko vidimo, da se je prevodnost raztopin z dodajanjem MTZ povečala. Kot so opisali v članku (11) MTZ, kljub temu, da ne ionizira, opazno poveča prevodnost raztopine PCL v DCM:DMF, kar lahko pripišemo izboljšani polarnosti raztopine. Iz SEM posnetkov lahko sklepamo, da je povprečni premer pri nanovlaknih, kjer imamo vgrajene 20 % učinkovine, večji kot pričakovano zaradi prisotnosti vozlov ter izkristalizirane učinkovine na površini.



Slika 29: Vpliv koncentracije vgrajenega MTZ v 10 % PCL nanovlakna na povprečno debelino nanovlaken

4.1.4 TEST NABREKANJA

Test nabrekanja praznih PCL nanovlaken smo izvajali v dveh paralelah. Rezultat izgube mase in stopnje nabrekanja smo podali kot povprečje obeh paralel (Tabela 6). Izguba mase po sušenju je bila 0 %, kar pomeni, da je topilo pri elektrostatskem sukanju popolnoma izhlapelo. Stopnja nabrekanja je v določenih časovnih intervalih je prikazana v Tabela 6.

Tabela 6: Stopnja nabrekanja v treh časovnih točkah

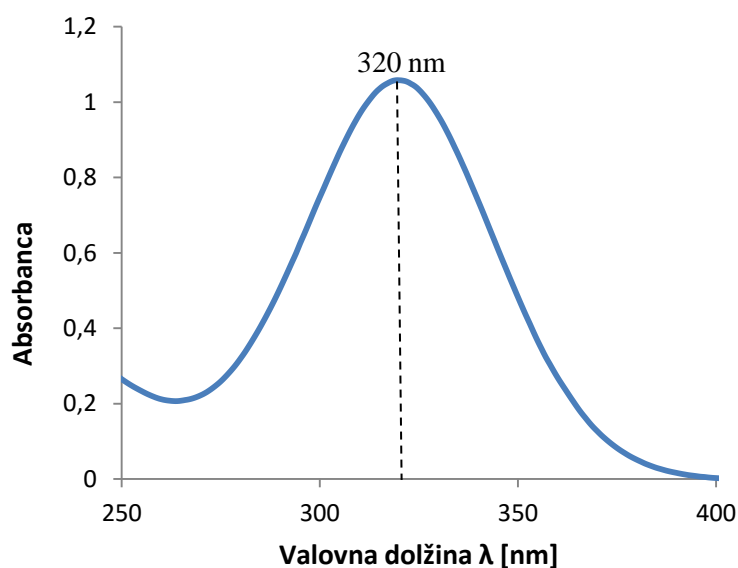
Čas [h]	Vzorec 1 [%]	Vzorec 2 [%]	Povprečna stopnja nabrekanja [%]
1	0,96	0	0,48
3	0,96	0,24	0,6
24	1,44	0,96	1,2

Kot vidimo iz rezultatov, naš vzorec ni nabrekal. Do majhnih odstotkov nabrekanja lahko pride zaradi napake pri tehtanju. Vzorce smo namreč po tem, ko smo jih vzeli ven iz pufra, osušili s filter papirjem, zaradi česar obstaja možnost, da je na našem vzorcu ostala kakšna zelo majhna kapljica pufra.

4.2 DOLOČANJE METRONIDAZOLA Z UV-VIS SPEKTROSKOPIJO

4.2.1 ABSORPCIJSKI SPEKTER MTZ

Za določanje sproščanja MTZ iz nanovlaken smo morali na začetku razviti analitsko metodo za določitev MTZ. Ker naša učinkovina absorbira v območju UV-VIS svetlobe, smo kot analizno tehniko za kvantitativno določanje MTZ v pufru izbrali UV-VIS spektroskopijo. Spekter na Slika 30 nam prikazuje absorbanco MTZ v pufru PBS s pH 6,8 v odvisnosti od valovne dolžine. Absorpcijski maksimum doseže pri valovni dolžini 320 nm, ki je bila uporabljena za vsa nadaljnja merjenja absorbancc vzorcev.



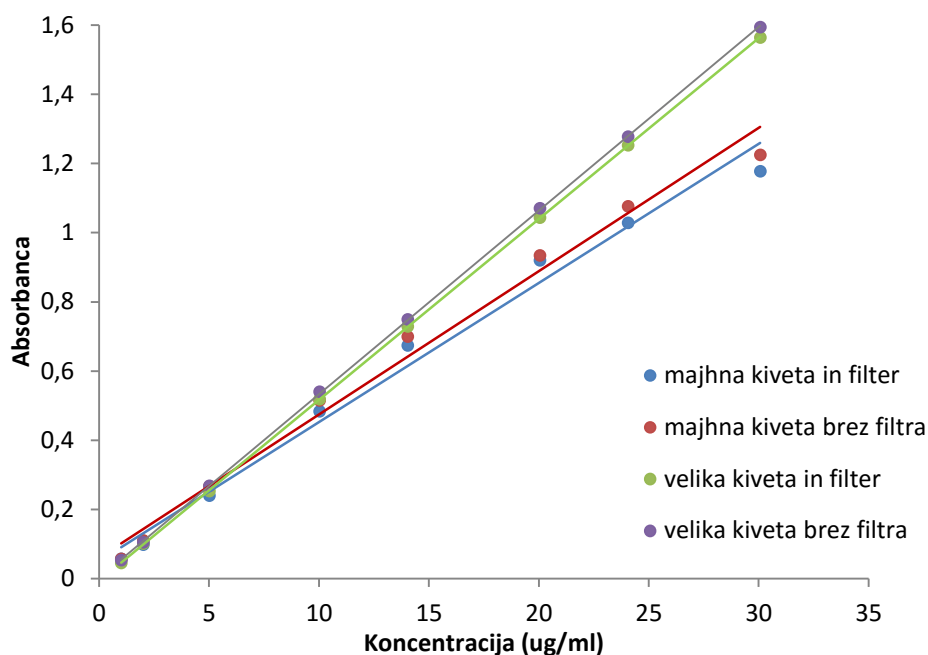
Slika 30: UV-VIS absorpcijski spekter MTZ v pufru s pH 6,8

4.2.2 UMERITVENA KRIVULJA ZA MTZ

Umeritveno krivuljo za MTZ smo izmerili na štiri načine, da bi ugotovili ali ima velikost uporabljene kivete oziroma predhodna filtracija vzorca, s katero bi odstranili neraztopljene delce, kakšen vpliv na izmerjene absorbance. Absorbance standardov smo merili v majhni in večji kiveti ter s predhodno filtracijo vzorcev ali brez (Tabela 7, Slika 31), pri valovni dolžini 320 nm, kjer ima MTZ najvišji vrh in zato tudi pri nizkih koncentracijah še vedno zaznaven manjši odziv. Pri absorpcijskem maksimumu je linearnost med absorbanco in koncentracijo največja. Na Slika 31 lahko opazimo razliko med umeritvenima krivuljama z meritvami v manjši in večji kiveti. Pri manjši kiveti je naklon umeritvene krivulje manjši ter tudi linearnost precej slabša. Vzrok bi lahko bil v minimalnem zaostanku destilirane vode, s katero smo spirali kiveto med vzorci, ki bi lahko razredčila naš vzorec. Temu smo se izognili tako, da smo kiveto na koncu sprali še z etanolom, jo s fenom posušili do suhega in nato ponovno naredili umeritveno krivuljo. Kljub temu je bila linearnost krivulje še vedno težava. Kot vidimo, filtracija vzorcev prek filtra z velikostjo por 0,45 µm pred merjenjem, ni imela večjega vpliva. Iz česar lahko sklepamo, da se je MTZ v pufru PBS dobro raztopil in delcev, ki bi lahko motili meritve, več ni bilo prisotnih. Za standard smo si izbrali umeritveno krivuljo večje kivete brez filtracije, razen takrat, kadar so bili vzorci za merjenje manjši od 1 mL in meritve v večji kiveti ni bila mogoča.

Tabela 7: Primerjava umeritvenih krivulj za MTZ

Velikost kivete	Filter	Umeritvena krivulja	R ²
majhna	DA	$y = 0,040x + 0,050$	0,986
majhna	NE	$y = 0,041x + 0,060$	0,987
velika	DA	$y = 0,052x - 0,006$	1
velika	NE	$y = 0,053x + 0,002$	1



Slika 31: Umeritvene krivulje za MTZ, izmerjene v manjši in večji kiveti ter s filtracijo in brez nje

4.2.3 SPECIFIČNOST UV-VIS METODE ZA DOLOČITEV MTZ

Specifičnost metode smo preverjali s sproščanjem praznih PCL nanovlaken v fosfatnem pufru s pH 6,8 in absorbanco vzorca merili pri valovni dolžini 320 nm, kjer ima MTZ absorpcijski maksimum, saj smo želeli videti ali sam PCL oziroma morebitne prisotne nečistoče absorbirajo pri tej valovni dolžini. Njihova prisotnost bi lahko motila naše meritve. V Tabela 8 so prikazane izmerjene absorbance vzorcev v treh različnih časovnih točkah glede na slepo raztopino, ki je bila v našem primeru PBS pufer. Absorbanca vzorcev vzetih v obdobju 12-ih dni je bila zelo majhna in glede na rezultate lahko zaključimo, da tako PCL kot možne nečistoče ne motijo meritev. PCL nanovlakna se v tem času tudi na videz niso spremenila.

Tabela 8: Absorbance praznih PCL nanovlaken v pufru s pH 6,8, merjene pri valovni dolžini 320 nm

Čas	A ($\lambda=320\text{nm}$)
18 ur	1,26E-03
3 dni	8,58E-04
12 dni	8,25E-04

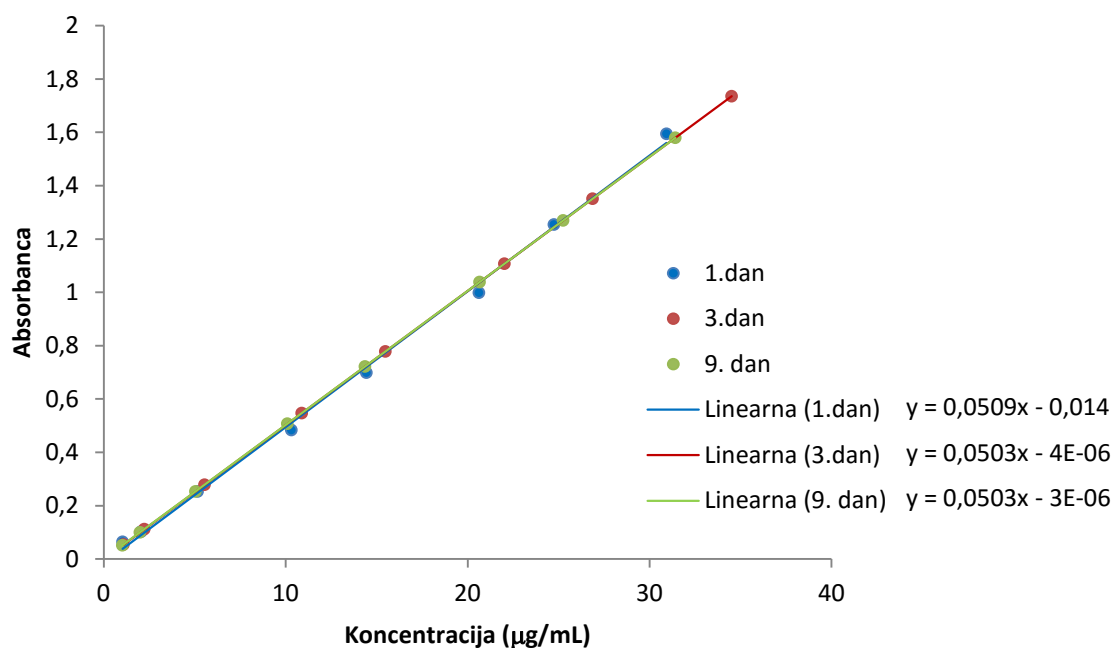
4.3 STABILNOST MTZ V FOSFATNEM PUFERU S pH 6,8

Standardnim raztopinam MTZ smo izmerili absorbanco še 3. in 9. dan po njihovi pripravi (Tabela 9), naredili nove umeritvene krivulje ter jih primerjali med seboj. Zanimala nas je stabilnost MTZ pri pH 6,8, ker je ta dober približek dejanskemu pH sline v ustih.

Tabela 9: Primerjava izmerjenih koncentracij MTZ dva in osem dni po pripravi standardov

	c [$\mu\text{g/ml}$] 1. dan	c [$\mu\text{g/ml}$] 3. dan	c [$\mu\text{g/ml}$] 9. dan	STD
F1 $\mu\text{g/ml}$	1,031	1,079	1,0205	0,0312
F2 $\mu\text{g/ml}$	2,062	2,2246	1,9858	0,1220
F5 $\mu\text{g/ml}$	5,155	5,5374	5,0363	0,2619
F10 $\mu\text{g/ml}$	10,31	10,88	10,089	0,4081
F14 $\mu\text{g/ml}$	14,434	15,477	14,355	0,6262
F20 $\mu\text{g/ml}$	20,62	22,02	20,655	0,7984
F24 $\mu\text{g/ml}$	24,744	26,867	25,247	1,1094
F30 $\mu\text{g/ml}$	30,93	34,511	31,413	1,9431

Umeritvene krivulje (Slika 32), ki smo jih naredili v treh časovnih točkah, se med seboj praktično ne razlikujejo. Če pogledamo izmerjene koncentracije v Tabela 9, lahko opazimo manjša odstopanja, iz katerih pa ne moremo sklepati, da gre za razgradnjo MTZ. Koncentracije se med seboj povsem naključno razlikujejo, ponekod je ta največja prvi dan in nato postopoma pada, drugod pa ravno obratno. Torej lahko te razlike v izmerjenih koncentracijah pripišemo le napaki pri merjenju. Glede na izenačene umeritvene krivulje lahko povzamemo, da je stabilnost MTZ v vodnem mediju dobra in znaki njegove razgradnje niso opazni v obdobju 12-ih dni, kar so opisali tudi že v literaturi (20).



Slika 32: Umeritvene krivulje MTZ v treh časovnih točkah

4.4 SPROŠČANJE

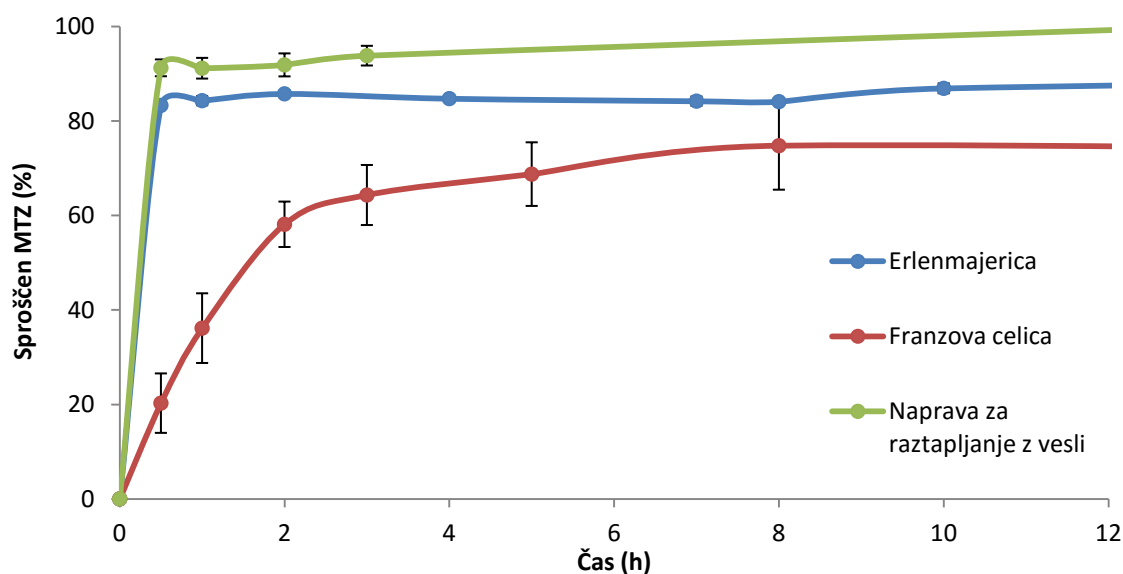
Glede na topnost MTZ, ki je bila boljša v zmesi topil DCM:DMF, in glede na rezultate, ki smo jih dobili s SEM analizo, smo si za sproščanje izbrali vzorce nanovlaken z vgrajeno učinkovino, izdelane iz 10 % raztopine PCL v DCM:DMF (3:2 v/v). V to raztopino smo uspeli vgraditi do 20 % MTZ. V nadaljevanju smo z namenom povečanja topnosti MTZ in s tem boljše vgradnje poskušali sproščati tudi nanovlakna iz 10 % raztopine PCL z dodano PAS (Span 80) in debelejša nanovlakna iz 15 % raztopine PCL v DCM:DMF (3:2 v/v) z vgrajeno učinkovino.

4.4.1 RAZVOJ METOD ZA SPREMLJANJE SPROŠČANJA MTZ

Sproščanje učinkovine iz nanovlaken smo preizkušali na tri različne načine:

- naprava za sproščanje z vesli (Erweka) z volumnom medija 500 mL,
- erlenmajerica z volumnom medija 200 mL in
- Franzova celica z volumnom medija 8,5 mL.

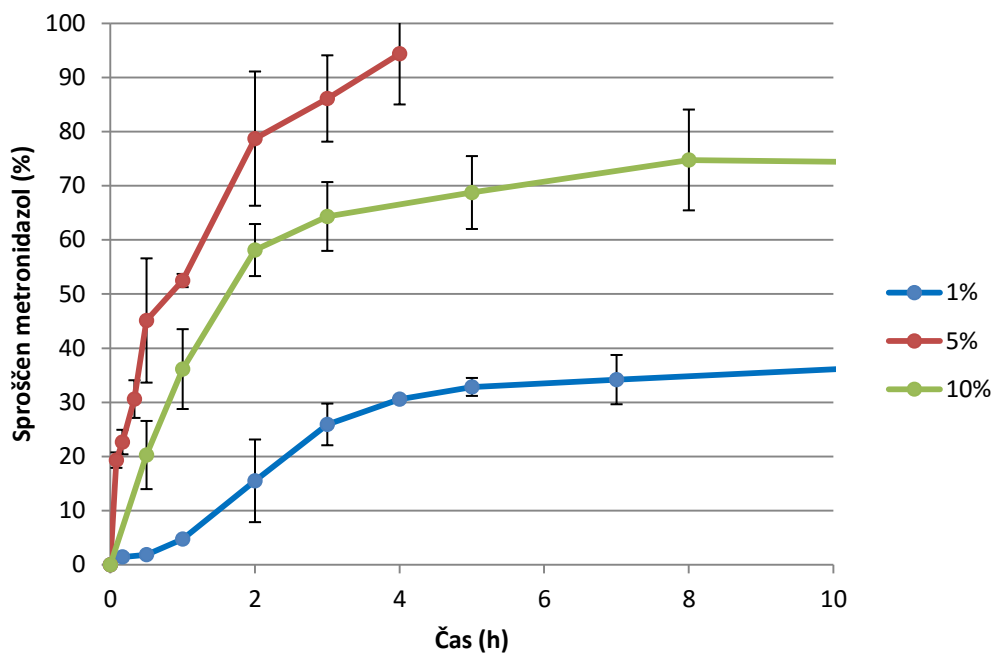
Vzorcem, ki smo jih jemali ob določenih časovnih točkah, smo z UV-VIS spektrofotometrom izmerili absorbance in preračunali koncentracijo MTZ. Profil sproščanja smo dobili iz odstotka sproščenega MTZ v odvisnosti od časa.



Slika 33: Primerjava sproščanj MTZ iz nanovlaken v treh različnih napravah: naprava za raztapljanje z vesli (Erweka), Franzova celica ter sproščanje v erlenmajerici.

Kot lahko vidimo na Slika 33 se nam je učinkovina iz nanovlaken, ki smo jih sproščali v erlenmajericah in napravi za raztapljanje Erweka, skoraj v celoti (> 90 %) sprostila v manj kot 1 uri. Ko smo uporabili Franzovo celico, se je hitrost sproščanja učinkovine nekoliko upočasnila, za kar bi lahko bil vzrok manjši volumen in posledično tudi manjši pretok ob mešanju medija v katerega se učinkovina sprošča. Ker smo želeli videti ali sama celica oz. membrana med donorskim in akceptorskim delom Franzove celice zadrži sproščanje, smo v Franzovi celici sproščali samo raztopino MTZ ter jo primerjali s sproščanjem MTZ, vgrajenega v PCL-nanovlakna. Ugotovili smo, da Franzova celica sama pripomore k zadržanemu sproščanju. Ker je v parodontalnem žepu izredno majhen volumen gingivalne tekočine, smo kot metodo za spremljanje sproščanja MTZ iz PCL-nanovlaken izbrali Franzovo celico, kjer smo uporabljali najmanjši volumen medija.

4.4.2 SPROŠČANJE MTZ IZ PCL-NANOVLAKEN PRIPRAVLJENIH IZ ZMESI DCM IN DMF

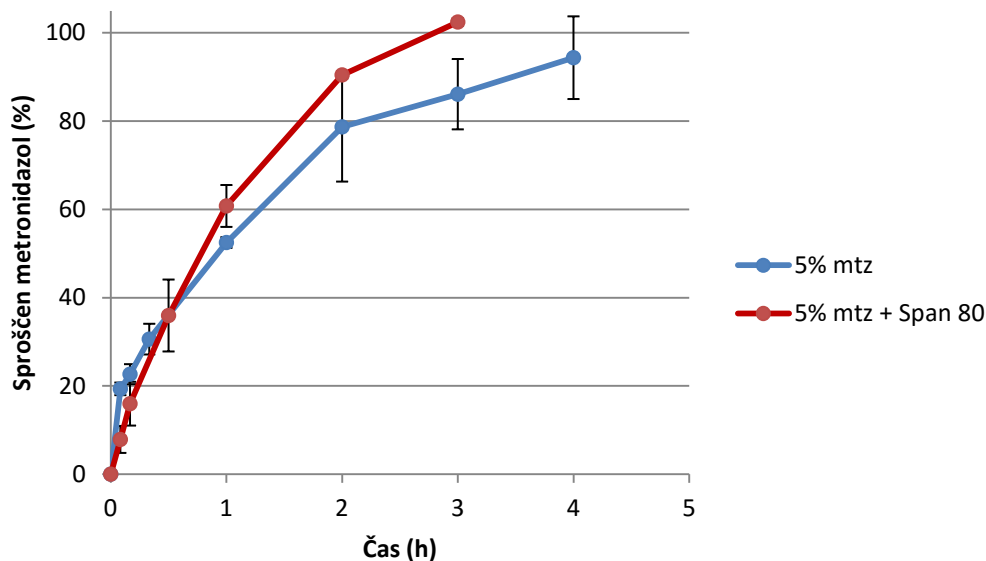


Slika 34: Primerjava sproščanj MTZ iz nanovlačen z različno koncentracijo vgrajene učinkovine

Pri višjem odstotku vgrajene učinkovine smo na SEM posnetkih lahko na površini nanovlačen videli ostanke neraztopljene ali kasneje izkristalizirane učinkovine. Večji odstotek MTZ zmanjša učinkovitost vgradnje učinkovine, saj pride do nastajanja agregatov, ki se ne morejo vgraditi v polimer, kar je pripomoglo k hitri sprostitvi učinkovine že v prvih dveh urah (Slika 34). Pri vgradnji 1 % učinkovine do tega ni prišlo. Ker pa si želimo vgraditi več kot 1 % učinkovine, ki se bo sproščala dalj časa, smo poskušali izdelati nanovlakna iz 10 % raztopine PCL z dodatkom PAS, ki je izboljšala topnost MTZ v dani zmesi topil in s tem njegovo vgradnjo v nanovlakna.

4.4.3 VPLIV DODATKA POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI (SPAN 80)

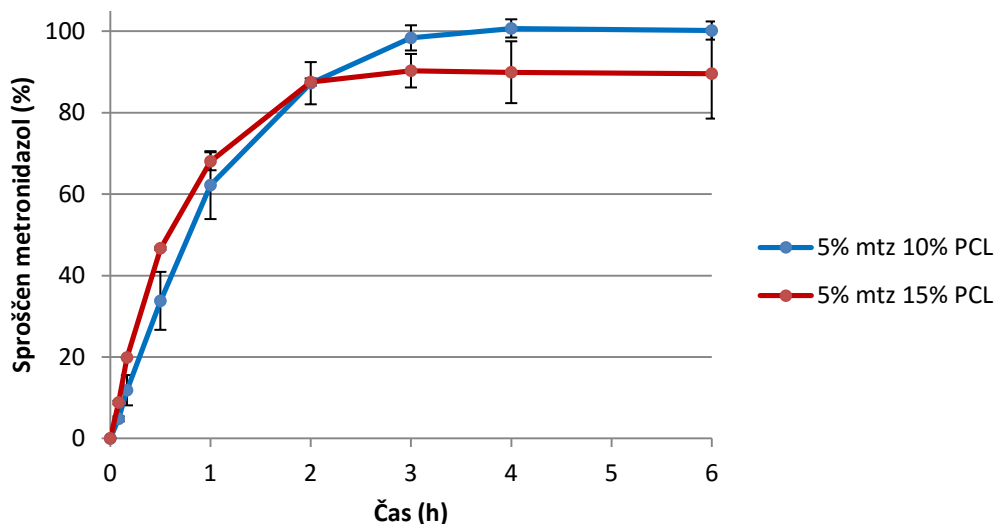
Glede na dobljene rezultate (Slika 35) lahko vidimo, da tudi dodatek Spana 80 in s tem izboljšana topnost MTZ v raztopini, ne zadrži sproščanja in se je učinkovina prav tako popolnoma sprostita v treh urah.



Slika 35: Primerjava v profilu sproščanja med nanovlakni, ki so bila pripravljena v raztopini DCM:DMF (3:2) in nanovlakni, ki smo jim v raztopino dodali še površinsko aktivno snov span 80.

4.4.4 VPLIV KONCENTRACIJE POLIMERA (PCL)

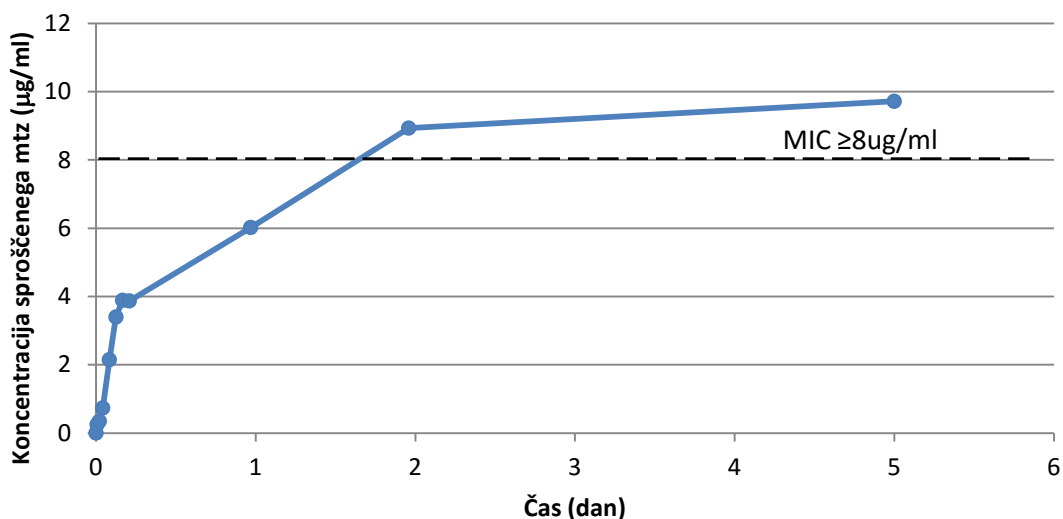
Na Slika 36 lahko vidimo, da tudi vgradnja učinkovine v nanovlakna iz 15 % PCL ni pripomogla k podaljšanju sproščanja. Pričakovali smo, da bomo z vgradnjo v debelejša nanovlakna, ki bodo imela daljšo difuzijsko pot za učinkovino, pripomogla k podaljšanem sproščanju MTZ, kar so raziskali tudi v članku (25), kjer so ugotovili, da je bilo sproščanje iz tanjših PCL nanovlaken hitrejše od nanovlaken, ki so imela večji premer. Vendar se je izkazalo drugače. Že glede na SEM posnetke teh nanovlaken, ki so bila zelo nepravilnih oblik in z ostanki izkristalizirane učinkovine na površini, smo se bali, da naš cilj tudi s povečanjem koncentracije PCL v raztopini ne bo dosežen.



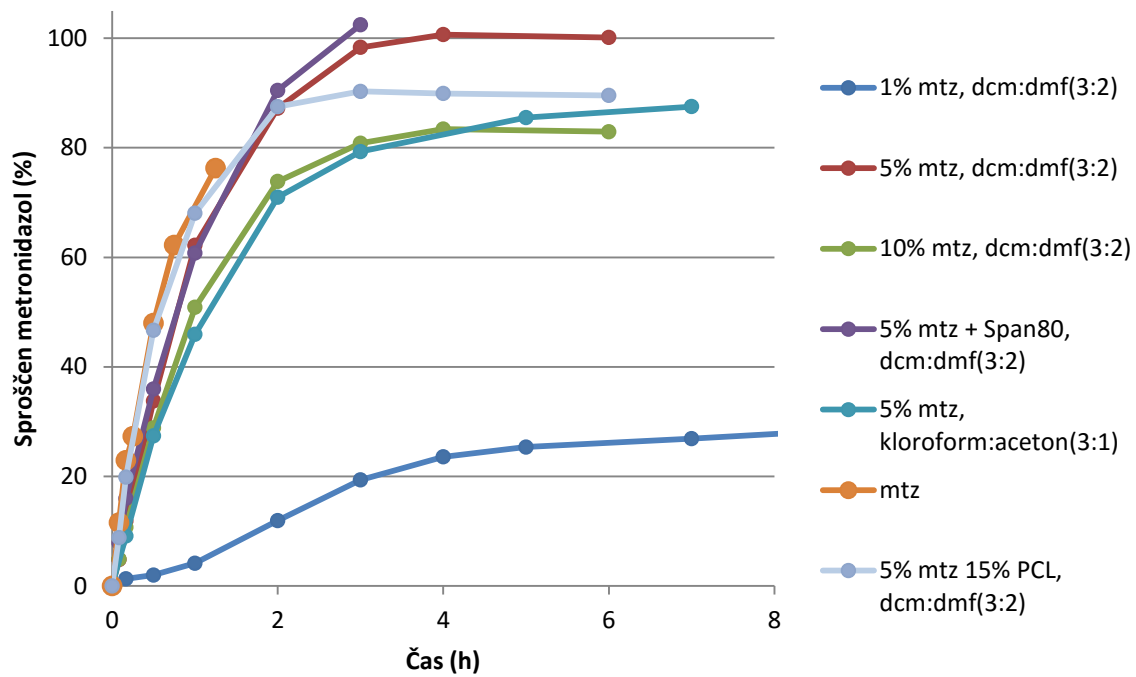
Slika 36: Sproščanje 5% MTZ iz 10% in 15% PCL nanovlaken

4.4.5 PRIMERJAVA VSEH SPROŠČANJ

Zadržano sproščanje je izkazovala le 1% vgradnja MTZ v PCL nanovlakna (10 %) (Slika 38). Čeprav je vgradnja zelo majhna, smo tudi tukaj dosegli koncentracijo, ki je bila višja od $MIC \geq 8 \mu\text{g/mL}$ (Slika 37). V našem primeru smo sproščali v Franzovi celici, ki ima volumen 8,5 mL. Upoštevati moramo, da je volumen gingivalne tekočine v obzornem žepu precej manjši in je tako MIC veliko prej dosežena.



Slika 37: Zadržano sproščanje iz PCL nanovlaken z vgrajenim 1 % MTZ



Slika 38: Primerjava vseh sproščanj učinkovine iz nanovlaken

5 SKLEP

Izbor topil za izdelavo nanovlaken in uspešnost vgradnje učinkovine se je izkazal za izredno pomemben faktor, saj mora biti za pripravo homogene disperzije topilo primerno tako za polimer kot tudi za učinkovino. Kot prvo smo si za pripravo PCL nanovlaken izbrali mešanico topil kloroforma in acetona v razmerju 3:1 ter pri vnaprej preizkušanih optimalnih pogojih elektrostatskega sukanja uspešno izdelali okrogla prazna nanovlakna. Ko smo želeli v nanovlakna vgraditi učinkovino, smo že pri 5 % MTZ glede na maso PCL opazili na površini izkristalizirano učinkovino, kar kaže na to, da se MTZ v takšni mešanici topil ni popolnoma raztopil. Zato smo si izbrali novo zmes topil, ki je bila sestavljena iz DCM in DMF v razmerju 3:2 V/V in v kateri je imel MTZ boljšo topnost.

Parametri za elektrostatsko sukanje so pomembni, saj smo ugotovili, da le pri določeni dovedeni električni napetosti, pretoku in razdalji med iglo in zbiralom dosežemo nastanek Taylorjevega stožca na konici igle, iz katerega se razteza en sam curek polimerne raztopine, ki vodi nato v nastanek okroglih nanovlaken brez vozlov. Takšne pogoje smo dosegli pri napetosti 12 kV, pretoku 1,981 mL/h in razdalji 20 cm, kjer smo iz 10 % raztopine PCL v DCM in DMF izdelali prazna nanovlakna s premerom 827 ± 292 nm.

Na premer nanovlaken so poleg prevodnosti vplivale tudi druge spremenljivke raztopine, kot so hlapnost topil, koncentracija polimera, viskoznost in površinska napetost. Večja prevodnost, manjša hlapnost topil in manjša viskoznost raztopine vodijo v nastanek tanjših nanovlaken brez vozlov. Od procesnih spremenljivk imata na premer nanovlaken največji vpliv dovedena električna napetost ter razdalja med iglo in zbiralom, kjer dobimo pri večji napetosti in daljši poti do zbirala tanjša nanovlakna.

Na vgradnjo MTZ vplivajo interakcije med učinkovino, polimernimi verigami in topilom. V nanovlakna smo vgradili 1-20 % MTZ, pri čemer smo pri vgradnji višji od 5 % na površini nanovlaken že lahko opazili delčke izkristalizirane učinkovine. Pri nižji vgradnji se MTZ dispergira v PCL matriks na molekularni ravni in zaradi tega do nastanka kristalov ne pride.

Sproščanje smo opravili z različnimi metodami sproščanja, pri katerih smo ugotovili, da ima na hitrost sproščanja iz nanovlaken vpliv tudi volumen medija. Ker je v parodontalnem žepu izredno majhen volumen gingivalne tekočine, smo kot metodo za spremljanje sproščanja MTZ iz PCL-nanovlaken izbrali Franzovo celico, kjer smo uporabljali najmanjši volumen medija. Na podlagi vrednotenja sproščanja smo uspeli dokazati, da so podaljšano sproščanje izkazovala le nanovlakna, izdelana iz 10 % raztopine PCL v zmesi

topil DCM:DMF (3:2) z vgrajenim 1 % MTZ. Tudi z vgradnjo MTZ v nanovlakna, kjer smo dodali raztopini polimera PAS ali povečali koncentracijo polimera, nismo dosegli bolj zadržanega sproščanja. Ker smo imeli v naših eksperimentalnih razmerah veliko večje volumne, kot je dejanski volumen medija v obzobnem žepu, lahko predvidimo, da bi bilo sproščanje v obzobnem žepu vseeno nekoliko počasnejše.

Uspešno smo izdelali PCL nanovlakna z vgrajenim MTZ, ki so bila pri nižji vgradnji učinkovine na videz okrogla in gladka ter so v primeru 1 % vgradnje MTZ izkazovala podaljšano sproščanje nad MIC. Želimo si, da bi bil odstotek vgradnje MTZ večji in bi bil tako volumen nanovlaken, potrebnih za dostavo na mesto delovanja, tj. v obzobni žep, pri zdravljenju parodontalne bolezni manjši in bolj prijazen za pacienta. Kot možnost za boljšo vgradnjo MTZ lahko predstavlja tudi izdelava večslojnih nanovlaken, kjer bi se učinkovina boljše porazdelila v notranjem sloju in tako preprečila njeno kristalizacijo na površini.

6 VIRI

- 1 U. Skalerič, R. Gašperšič: Agresivni parodontitis. *Zobozdravstveni vestnik* 2006; 61: 44-45
- 2 <http://umm.edu/health/medical/reports/articles/periodontal-disease>, 23.12.2014
- 3 http://en.wikipedia.org/wiki/Periodontal_pathology, 23.12.2014
- 4 Š. Zupančič, P. Kocbek, S. Baumgartner, J. Kristl. Contribution of nanotechnology to improved treatment of periodontal disease. *Current pharmaceutical design*, 22, 2015, 3257-3271
- 5 <https://dentodontics.com/2015/11/03/stages-of-gum-disease>, 22.7.2016
- 6 M. Florjanič, J. Kristl: Proučevanje razkužilnega učinka ozona na planktonske in biofilmske mikroorganizme v prečiščeni vodi v dinamičnem laboratorijskem in industrijskem okolju. *Farmacevtski vestnik*, 2010: 61
- 7 A. B. Berezow & R. P. Darveau: Microbial shift and periodontitis. *Periodontology* 2000, Vol.55, 2011, 36-47
- 8 Sreeja C. Nair and K. R. Anoop: Intraperiodontal pocket: And ideal route for local antimicrobial drug delivery. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2012; 3(1): 9-15
- 9 <http://www.piramide-ambiente.it>, 22.7.2016
- 10 <http://www.drleeannhovich.com/procedures.html>, 22.7.2016
- 11 M. Zamani, M. Morshed, J. Varshosaz, M. Jannesari: Controlled release of metronidazole benzoate from poly e-caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75(2010): 179-185
- 12 T. Prasad Chaturvedi, R. Srivastava, A. Kumar Srivastava, V. Gupta, P. Kumar Verma: Evaluation of metronidazole nanofibers in patients with chronic periodontitis: A clinical study. *Int J Pharm Investig.* 2012; 2(4): 213–217
- 13 W. Yao, P. Xu, Z. Pang, J. Zhao, Z. Chai, X. Li, H. Li, M. Jiang, H. Cheng, B. Zhang and N. Cheng: Local delivery of minocycline-loaded PEG-PLA nanoparticles for the enhanced treatment of periodontitis in dogs. *International Journal of Nanomedicine* 2014; 9: 3963-3970
- 14 T. P. Chaturvedi, R. Srivastava, A. K. Srivastava, V. Gupta, P. K. Verma: Doxycycline Poly E-Caprolactone Nanofibers in Patients with Chronic

- Periodontitis- A clinical Evaluation. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2013, 7(10): 2339-2342
- 15 P. S. Gungor-Ozkerim, T. Balkan, G. T. Kose, A. Sezai Sarac, F. N. Kok: Incorporation of growth factor loaded microspheres into polymeric electrospun nanofibers for tissue engineering applications. *Journal of biomedical materials research* 2014, 102A
 - 16 M. Prabakaran, R. Jayakumar, S. V. Nair: Electrospun Nanofibrous Scaffolds- Current Status and Prospects in Drug Delivery. *Adv Polym Sci* (2012) 246: 241-262
 - 17 *Medicamenta, parte monografica, settima edizione, V5: 602-606*
 - 18 <http://www.drugs.com/pro/metronidazole.html>, 4.10.2014
 - 19 <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00916>, 7.10.2014
 - 20 Y. Wu, R. Fassihi: Stability of metronidazole, tetracycline HCL and famotidine alone and in combination. *International Journal of Pharmaceutics* 290 (2005) 1-13
 - 21 Ü. Noyan, S. Yilmaz, B. Kuru, T. Kadir, O. Acar and E. Büget. A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology* 1997: 24: 158-165
 - 22 L. Perioli, V. Ambrogi, D. Rubini, S. Giovagnoli, M. Ricci, P. Blasi, C. Rossi. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release* 95 (2004): 521-533
 - 23 A. Guerrero, G. S. Griffiths, L. Niball, J. Suvan, D. R. Moles, L. Laurell and M. S. Tonetti. Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 2005: 32: 1096-1107
 - 24 T. Berglundh, L. Krok, B. Liljenberg, E. Westfelt, G. Serino and J. Lindhe. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 1998: 25: 354-362
 - 25 J. Xue, M. He, Y. Niu, H. Liu, A. Crawford, P. Coates, D. Chen, R. Shi, L. Zhang. Preparation and in vivo efficient anti-infection property of GTR/GBR implant made by metronidazole loaded electrospun polycaprolactone nanofiber membrane. *International Journal of Pharmaceutics* 475 (2014): 566-577

- 26 K. Kataria, A. Sharma, T. Garg, A. K. Goyal and G:Rath. Novel technology to improve drug loading in polymeric nanofibers. *Drug Delivery Letters* 4 (2014): 79-86
- 27 R. Rošic, J. Pelipenko, J. Kristl, P. Kocbek in S. Baumgartner: Properties, Engineering and Applications of Polymeric Nanofibers: Current Research and Future Advances. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 26 (4) (2012): 417-425
- 28 Ž. Jeraj: Vpliv topil na izdelavo polikaprolaktonskih nanovlaken z elektrostatskim sukanjem. *Diplomska naloga Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo*, 2013
- 29 J. Pelipenko, P. Kocbek, J. Kristl. Critical attributes of nanofibers : Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *International journal of pharmaceutics*, 484, 2015, 57-74
- 30 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*, 456, 2013, 125-134
- 31 Š. Zupančič, S. Sinha-Ray, S. Sinha-Ray, J. Kristl, A. L. Yarin. Controlled release of ciprofloxacin from core - shell nanofibers with monolithic or blended core. *Molecular pharmaceutics*, 13, 2016, 1393-1404
- 32 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, vol. 13, iss. 1, str. 295-305
- 33 R. Rošic, J. Pelipenko, P. Kocbek, S. Baumgartner, M. Bešter-Rogač, J. Kristl. The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning. *European Polymer Journal*, 48, 2012, 1374-1384
- 34 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, vol. 75, str. 101-113
- 35 Š. Zupančič, S. Baumgartner, Z. Lavrič, M. Petelin, J. Kristl. Local delivery of resveratrol using polycaprolactone nanofibers for treatment of periodontal disease. *Journal of drug delivery science and technology*, 30, 2015, 408-416
- 36 D. H. Reneker, A. L. Yarin: Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer* 49 (2008) 2387-2425

- 37 X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, X. Jing: Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release* 185 (2014) 12-21
- 38 M. Jannesari, J. Varshosaz, M. Morshed, M. Zamani: Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *International Journal of Nanomedicine* 2011; 6: 993-1001.
- 39 V. Beachley, X. Wen: Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 663-668
- 40 Z. Li and C. Wang: Effects of working parameters on electrospinning. *One-dimensional nanostructures*, SpringerBriefs in Materials, 2013
- 41 V. Pillay, C. Dott, Y. E. Choonara, C. Tyagi, L. Tomar, P. Kumar, L. C. du Toit, V. M. K. Ndesendo: A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. *Journal of nanomaterials*, volume 2013
- 42 E. Valarezo, V. Vittoria: Innovative processes for the production of new nanocomposite materials by electrospinning technique. Department of chemical and food engineering, Ph.D course in chemical engineering, 2013
- 43 N. Bhattarai, Z. Li, J. Gunn, M. Leung, A. Cooper, D. Edmondson, O. Veiseh, M. Chen, Y. Zhang, R. G. Ellenbogen and M. Zhang: Natural-Synthetic Polyblend Nanofibers for Biomedical Applications. *Advanced Materials* 2009 (21): 2792-2797
- 44 M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher: The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 35 (2010): 1217-1256
- 45 T. K. Dash, V. B. Konkimalla: Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review. *Journal of Controlled Release* 158 (2012): 15-33
- 46 Z. McEachin, K. Lozano: Production and Characterization of Polycaprolactone Nanofibers via ForcespinningTM Technology. *Journal of Applied Polymer Science*, Volume 126, Issue 2, 473–479, 15 October 2012

- 47 M. Abedalwafa, F. Wang, L. Wang and C. Li: Biodegradable Poly- ϵ -caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. *Rev.adv.Mater.Sci.* 34 (2013) 123-140
- 48 <https://en.wikipedia.org/saliva>, 15.3.2016
- 49 M. Gosenca, M. Gašperlin: Membrane za in vitro testiranje dermalne absorpcije. *Farmaceutski vestnik* 2009, 60, 8-12
- 50 S. Kumar Tiwari, R. Tzezana, E. Tzssman, S. S. Venkatraman: Optimizing partition-controlled drug release from electrospun core-shell fibers. *International Journal of Pharmaceutics* 392 (2010) 209-217
- 51 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dichloromethane#section=Chemical-and-Physical-Properties>, 24.7.2016
- 52 <https://en.wikipedia.org/wiki/Solvent>, 5.8.2016
- 53 C. J. Luo, E. Stride, M. Edirisinghe: Mapping the influence of Solubility and Dielectric Constant on Electrospinning Polycaprolactone Solutions. *Macromolecules* 2012, 45, 4669-4680