

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA FORTUNA

DIPLOMSKA NALOGA

**HITOSANSKA NANOVLAKNA: IZDELAVA, VREDNOTENJE TER
IN VITRO PREVERJANJE CELIČNEGA ODZIVA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA FORTUNA

**HITOSANSKA NANOVLAKNA: IZDELAVA, VREDNOTENJE TER
IN VITRO PREVERJANJE CELIČNEGA ODZIVA**

**CHITOSAN NANOFIBRES: FORMULATION,
CHARACTERISATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF CELL
RESPONSE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag.farm.

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorici doc. dr. Petri Kocbek, mag.farm., za strokovno pomoč, potrpežljivost, dosegljivost, trud in razumevanje pri izvedbi diplomske naloge.

Za koristne nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Petre Kocbek, mag.farm.

Andreja Fortuna

Diplomska komisija:

Predsednik: izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag.farm.

Mentorica: doc. dr. Petra Kocbek, mag.farm.

Član: doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
KAZALO ENAČB.....	VI
POVZETEK	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1. UVOD	1
1.1. NANOVLAKNA	1
1.2. IZDELAVA NANOVLAKEN	1
1.3. ELEKTROSTATSKO SUKANJE.....	2
1.3.1. Vrste zbiral	4
1.3.2. Vrste šob.....	5
1.4. SPREMENLJIVKE ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA.....	6
1.4.1. SPREMENLJIVKE POLIMERNE RAZTOPINE	7
1.4.1.1. Koncentracija	7
1.4.1.2. Molekulska masa polimera.....	7
1.4.1.3. Viskoznost.....	8
1.4.1.4. Površinska napetost	8
1.4.1.3. Prevodnost.....	8
1.4.2. SPREMENLJIVKE TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA	9
1.4.2.1. Napetost električnega polja	9
1.4.2.2. Pretok polimerne raztopine	10
1.4.2.3. Razdalja med konico igle in zbiralom.....	11
1.4.3. SPREMENLJIVKE OKOLJA.....	11
1.5. UPORABA NANOVLAKEN	12
1.5.1. Nanovlakna kot ogrodja za uporabo na podočju tkivnega inženirstva	12
1.5.2. Sodobne obloge za pospešeno celjenje ran.....	14

1.5.3. Dostavni sistemi za nadzorovano sproščanje učinkovin	14
1.6. POLIMERI ZA IZDELAVO NANOVLAKEN	15
1.7. TOPILA ZA IZDELAVO NANOVLAKEN	17
1.8. IZDELAVA HITOSANSKIH NANOVLAKEN.....	18
1.9. <i>IN VITRO</i> BIOLOŠKO VREDNOTENJE.....	19
2. NAMEN DELA	21
3. EKSPERIMENTALNI DEL	22
3.1. IZDELAVA NANOVLAKEN	22
3.1.1. MATERIALI	22
3.1.2. NAPRAVE	23
3.1.2.1. Priprava polimernih raztopin.....	23
3.1.2.2. Vrednotenje spremenljivk polimerne raztopine	23
3.1.2.3. Izdelava in spiranje nanovlaken	23
3.1.2.4. Vrednotenje izdelanih nanovlaken	24
3.1.3. METODE	24
3.1.3.1. Priprava polimernih raztopin.....	24
3.1.3.2. Vrednotenje spremenljivk polimerne raztopine	24
3.1.3.3. Izdelava in spiranje nanovlaken	25
3.1.3.4. Vrednotenje izdelanih nanovlaken	26
3.2. <i>IN VITRO</i> BIOLOŠKO VREDNOTENJE.....	26
3.2.1. MATERIALI	26
3.2.2. NAPRAVE	27
3.2.3. METODE	27
3.2.3.1. Gojenje celične linije keratinocitov.....	27
3.2.3.2. Priprava polimernih filmov in nanovlaken za <i>in vitro</i> biološko vrednotenje.....	28
3.2.3.3. Vrednotenje vpliva polimernih filmov in nanovlaken na keratinocite	29
3.2.3.6. Vrednotenje metabolne aktivnosti celic na nanovlaknih z MTS testom	30
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1. VREDNOTENJE SPREMENLJIVK POLIMERNE RAZTOPINE.....	31

4.1.1. Prevodnost	31
4.1.2. Površinska napetost	33
4.1.3. Viskoznost	35
4.2. VREDNOTENJE SPREMENLJIVK TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA	41
4.2.1. Razdalja od konice igle do zbirala.....	41
4.2.2. Napetost električnega polja	42
4.2.3. Pretok polimerne raztopine.....	42
4.2.4. Pretok zraka	43
4.3. VREDNOTENJE IZDELANIH NANOVLAKEN.....	44
4.4. <i>IN VITRO</i> PREVERJANJE CELIČNEGA ODZIVA.....	55
4.4.1. Vrednotenje celičnega odziva z invertno svetlobno mikroskopijo	56
4.4.2. Vrednotenje celičnega odziva s fluorescenčno mikroskopijo.....	62
4.4.3. Vrednotenje metabolne aktivnosti celic na nanovlaknih z MTS testom	64
5. SKLEP.....	66
6. LITERATURA.....	68

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz elektrostatskega sukanja.....	2
Slika 2: Naprava za elektrostatsko sukanje, ki smo jo uporabljali pri raziskovalnem delu.	3
Slika 3: Shema različnih vrst zbiral.	4
Slika 4: Shema cilindričnega premičnega vretena.	5
Slika 5: Poliuretansko zbiralo Tegaderm™.	5
Slika 6: Shema različnih vrst šob.....	6
Slika 7: Shematski prikaz vpliva električne napetosti na obliko kapljice polimerne raztopine in na morfologijo izdelanih NV.	10
Slika 8: Kemijska struktura hitosana.	22
Slika 9: Kemijska struktura PEO.	22
Slika 10: Kemijska struktura Triton X-100.	22
Slika 11: Kemijska struktura DMSO.	22
Slika 12: Kemijski strukturi MTS reagenta in formazana.	30
Slika 13: Primerjava prevodnosti raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 30 % oz. 3 % očetni kislini.	31
Slika 14: Primerjava prevodnosti raztopin polimernih zmesi LMW Hit oz. MMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.	31
Slika 15: Primerjava površinske napetosti raztopin polimernih zmesi LMW Hit oz. MMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.	34
Slika 16: Viskoznost raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 30 % očetni kislini.....	36
Slika 17: Viskoznost raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.....	36
Slika 18: Viskoznost raztopin polimernih zmesi MMW Hit in PEO v 30 % očetni kislini.....	36
Slika 19: Viskoznost raztopin LMW Hit in PEO ter njunih zmesi v odvisnosti od strižne napetosti.	39
Slika 20: Viskoznost raztopin polimernih zmesi LMW Hit/PEO z razmerjem 60/40 (v/v) v 30 % očetni kislini.	41
Slika 21: Produkt elektrostatskega sukanja, pripravljen: (A) v digestoriju in (B) izven digestorija.....	43
Slika 22: Povprečni premeri NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO.....	44
Slika 23: Povprečni premeri NV iz raztopin polimernih zmesi MMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.....	44
Slika 24: SEM slike NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO, topilo: 30 % očetna kislina, zbiralo: aluminijasta folija.	46
Slika 25: SEM slike NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO, topilo: 30 % očetna kislina, zbiralo: aluminijasta folija ali gaza.....	46

Slika 26: SEM slike NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO, topilo: 3 % očetna kislina, zbiralo: gaza.	47
Slika 27: SEM slike NV brez dodatka Triton X-100 TM na treh različnih zbiralih pri večji povečavi.	48
Slika 28: SEM slike NV z ali brez dodatka Triton X-100 TM na treh različnih zbiralih pri manjši povečavi.	48
Slika 29: SEM slike NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in LV Hit v razmerju 1:1 ter PEO,	49
Slika 30: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi MMW Hit/PEO z razmerjem 95/5 (v/v), topilo: 3 % očetna kislina.	50
Slika 31: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi MMW Hit/PEO z razmerjem 90/10 (v/v), topilo: 3 % očetna kislina.	51
Slika 32: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi MMW Hit/PEO z razmerjem 80/20 (v/v), topilo: 3 % očetna kislina.	51
Slika 33: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi MMW Hit/PEO z razmerjem 70/30 (v/v), topilo: 3 % očetna kislina.	52
Slika 34: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi MMW Hit/PEO z razmerjem 60/40 (v/v), topilo: 3 % očetna kislina.	52
Slika 35: SEM slike NV iz aluminijaste folije poleg krovnih stekelc.	53
Slika 36: SEM slike vzorca iz območja mokrega madeža. Elektrostatsko sukanje je potekalo izven odsesovalne komore.	53
Slika 37: SEM slike NV iz dveh različnih poskusov.	54
Slika 38: SEM slike NV z ali brez sotpila (DMSO) oz. PAS (Triton X-100).	55
Slika 39: Keratinociti v kulturi po 48 h gojenja na polimernih filmih iz raztopin zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.	57
Slika 40: Keratinociti v kulturi po 48 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi MMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.	58
Slika 41: Keratinociti v kulturi po 24 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini. NV so bila predhodno sprana samo s PBS.	59
Slika 42: Keratinociti v kulturi po 24 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini. NV so bila predhodno sprana z etanolom in PBS.	60
Slika 43: Keratinociti v kulturi po 96 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini. NV so bila predhodno sprana samo s PBS.	61
Slika 44: Keratinociti v kulturi po 96 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini. NV so bila predhodno sprana z etanolom in PBS.	62

Slika 45: Keratinociti v kulturi po 72 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi MMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.	63
Slika 46: Keratinociti v kulturi po 72 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.	64

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Primerjava pH 3 % in 30 % vodne raztopine očetne kisline.	32
Preglednica II: Primerjava prevodnosti raztopin PEO in LMW Hit v 3 % oz. 30 % očetni kislini.	32
Preglednica III: Primerjava prevodnosti raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO z razmerjem 60/40 (v/v) v 30 % očetni kislini.	33
Preglednica IV: Primerjava viskoznosti raztopin LMW Hit in MMW Hit v 3 % in 30 % očetni kislini.	35
Preglednica V: Primerjava viskoznosti raztopin PEO, LMW Hit in njunih zmesi brez DMSO in Triton X-100.	38
Preglednica VI: Celokupna koncentracija polimera, tj. hitosana (Hit) in PEO, v končni zmesi. ...	39
Preglednica VII: Spremenljivke elektrostatskega sukanja, ki so zagotavljale stabilen curek.	41
Preglednica VIII: Rezultati MTS testa na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit/PEO z razmerjem 70/30 (v/v) v 30 % očetni kislini.	65

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun številčne koncentracije celic.	28
--	----

POVZETEK

Nanovlakna so trdna vlakna, ki zaradi svojega premera v nanometrskem območju izkazujejo specifične lastnosti. V zadnjem času so zelo aktualna polimerna nanovlakna, izdelana s postopkom elektrostatskega sukanja, saj lahko z izbiro ustreznih spremenljivk polimerne raztopine in spremenljivk tehnološkega postopka vplivamo na mehansko trdnost vlaken, njihovo morfologijo in premer. Tako lahko izdelamo specifična nanovlakna za različne namene uporabe.

Polimerna nanovlakna s svojo nanotopografijo posnemajo zgradbo zunajceličnega ogrodja in imajo zato velik potencial za uporabo na področju tkivnega inženirstva. Mreže nanovlaken se lahko uporabljajo pri razvoju tkivnih nadomestkov, saj omogočajo obnovo, vzdrževanje ali pa celo izboljšanje funkcij poškodovanega tkiva. Na tak način lahko dosežemo popolno vključitev nadomestka v organizem pacienta. Po drugi strani se nanovlakna uporabljajo tudi za izdelavo sodobnih oblog za hitrejše celjenje ran. Le-te rano zaščitijo pred sekundarno infekcijo, omogočajo izmenjavo plinov, absorbirajo presežek izločkov in rano ustrezno vlažijo, da se ta ne izsuši in razpoka. Zato je bil namen diplomske naloge z metodo elektrostatskega sukanja izdelati hitosanska nanovlakna, ki bi bila primerna za izdelavo kožnih nadomestkov ali sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran. Elektrostatsko sukanje same hitosanske raztopine je zelo težaven proces, zato smo poleg hitosana uporabili še dodaten polimer polietilenoksid in tako izdelali nanovlakna z razmerjem Hit/PEO 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 (v/v). Za izdelavo nanovlaken smo uporabili različne vrste hitosana: hitosan nizke molekulske mase, hitosan nizke viskoznosti in hitosan srednje molekulske mase. Tako hitosan kot tudi polietilenoksid smo raztopili bodisi v 3 % bodisi v 30 % očetni kislini. Nazadnje smo v raztopine polimernih zmesi dodali še neionogeno površinsko aktivno snov Triton X-100TM in sotopilo organskega izvora DMSO, da bi tako še dodatno izboljšali lastnosti raztopin polimernih zmesi in s tem vplivali na produkt elektrostatskega sukanja.

Pred elektrostatskim sukanjem smo ovrednotili spremenljivke polimernih raztopin, kar pomeni, da smo raztopinam polimernih zmesi hitosana in polietilenoksida izmerili prevodnost, površinsko napetost in viskoznost. Glede na dobljene rezultate smo nato določili spremenljivke tehnološkega postopka, tj. razdaljo med konico igle in zbiralom, napetost električnega polja in pretok črpalke, pri katerih se je na konici igle oblikoval stabilen, kontinuiran curek. Morfologijo izdelanih nanovlaken smo opazovali pod vrstičnim elektronskim mikroskopom in s pomočjo računalniškega programa ImageJ

izmerili premer vlaken. Prišli smo do naslednjih ugotovitev: 1.) nanovlakna najlepše morfologije smo pripravili iz zmesi hitosana nizke molekulske mase in polietilenoksida, ki smo ju raztopili v 30 % očetni kislini; 2.) za nastanek nanovlaken je k raztopini hitosana potrebno dodati najmanj 10 % polietilenoksida; 3.) z zmanjševanjem deleža polietilenoksida v zmesi se morfologija nanovlaken spreminja iz vlaknate v vozlasto, hkrati pa se manjša tudi premer vlaken od 100 do 20 nm; 4.) izdelava nanovlaken brez dodatka Triton X-100TM in DMSO v raztopino je manj uspešna, saj dobimo predvsem vozle in le zelo majhne količine nanovlaken; 5.) med proučevanimi zbirali se je kot najboljša izkazala aluminijasta folija; 6.) morfologija vseh nanovlaken, ne glede na vrsto hitosana, se po spiranju spremeni; 7.) za uspešno izdelavo nanovlaken je elektrostatsko sukanje potrebno izvajati v prostoru z odzračevanjem; 8.) izdelava nanovlaken je težko ponovljiv proces, saj nanj vpliva vrsta znanih in neznanih spremenljivk.

Na koncu je sledilo še *in vitro* biološko vrednotenje odziva keratinocitov na izdelana nanovlakna, pri čemer smo si pomagali z invertno svetlobno in fluorescenčno mikroskopijo ter MTS testom. Prišli smo do naslednjih ugotovitev: 1.) celice se pritrdijo in razmnožujejo na vseh izdelanih nanovlaknih; 2.) celice, ki rastejo na nanovlaknih, spremenijo morfologijo in rastejo v kroglastih skupkih, v primerjavi z vretenasto morfologijo, ki je značilna za rast celic kontrole; 3.) celice, ki rastejo na nanovlaknih iz zmesi hitosana nizke molekulske mase in polietilenoksida z razmerjem 70/30 (v/v), po 96 h v kulturi spremenijo morfologijo iz kroglaste v vretenasto, kar pomeni, da postanejo podobne celicam kontrole; 3.) izrastki so najdaljši in najbolj opazni pri keratinocitih, ki rastejo na nanovlaknih iz zmesi hitosana nizke molekulske mase in polietilenoksida z razmerjem 70/30 (v/v); 4.) keratinociti se tesno vpletejo v nanovlakna iz zmesi hitosana nizke molekulske mase in polietilenoksida z razmerjem 70/30 (v/v), saj se celice niti po 10 min tripsinizacije niso popolnoma ločile od podlage.

Ker se keratinociti, ki rastejo na nanovlaknih iz zmesi hitosana nizke molekulske mase in polietilenoksida z razmerjem 70/30 (v/v), med seboj tesno povežejo in ker se poleg tega tudi močno vključijo v ogrodje iz nanovlaken, lahko zaključimo, da so za izdelavo kožnih nadomestkov in sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran najbolj primerna nanovlakna, izdelana iz 70 % hitosana nizke molekulske mase in 30 % polietilenoksida.

SEZNAM OKRAJŠAV

LMW Hit.....hitosan nizke molekulske mase (angl. »low molecular weight«)

LV Hit..... hitosan nizke viskoznosti (angl. »low viscosity«)

MMW Hit..... hitosan srednje molekulske mase (angl. »medium molecular weight«)

NV..... nanovlakna

PAS.....površinsko aktivna snov

PBS.....fosfatna puferska raztopina (angl. »phosphate buffered saline«)

PEO.....polietilenoksid

SEM.....vrstični elektronski mikroskop (angl. »scanning electron microscope«)

1. UVOD

1.1. NANOVLAKNA

Izraz nanovlakno (NV) je sestavljeno iz predpone nano in korena vlakno. Sama beseda vlakno izvira iz latinskega izraza »fibra« in pomeni tanko podolgovato nitasto strukturo (1). Po drugi strani predpona nano izvira iz grškega izraza »nanos« ali »nannos« in v prevodu pomeni palček oz. pritlikavec, v mednarodnem sistemu merskih enot pa izraz pomeni strukture z vsaj eno dimenzijo v velikostnem razredu 10^{-9} m (1). Nekateri med nanostrukture štejejo zgolj tiste, ki so manjše od 100 nm, medtem ko drugi zagovarjajo bolj široko definicijo in med nanostrukture uvrščajo tudi tiste, ki so v velikostnem razredu do 500 nm (1). NV so trdna vlakna, ki zaradi svojega premera v nanometrskem območju izkazujejo specifične fizikalne in kemijske lastnosti (2). Tako v študijah poročajo o izredno velikem razmerju med površino in volumnom NV, o teoretično neomejeni dolžini vlaken in pa o veliki poroznosti mreže NV (3).

1.2. IZDELAVA NANOVLAKEN

Polimerna vlakna mikro- in nanovelikosti lahko izdelamo na različne načine, pri čemer postopek izdelave lahko temelji na fizikalnih, kemičnih, termičnih ali elektrostatskih osnovah (4). Tako poznamo več metod za izdelavo NV:

- ~ metoda elektrostatskega sukanja (angl. »electrospinning«),
- ~ metoda samozdruževanja (angl. »self-assembly«),
- ~ metoda ločevanja faz (angl. »phase separation«),
- ~ metoda uporabe šablon (angl. »templating«),
- ~ metoda risanja (angl. »drawing«),
- ~ metoda ekstrakcije (angl. »extraction«),
- ~ metoda polimerizacije parne faze (angl. »vapour-phase polymerisation«) (4).

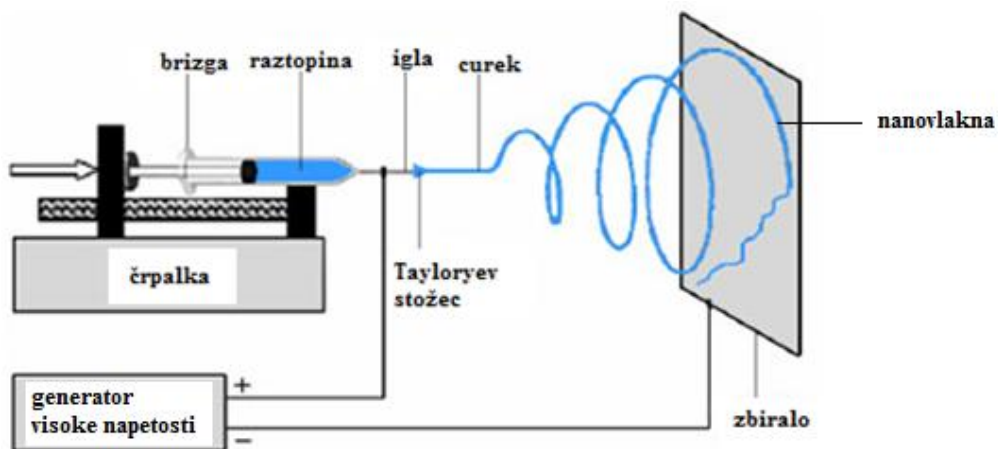
Večina naštetih metod je zelo specifičnih, saj je njihova uporaba omejena na izbran polimer ali pa pri izdelavi ne omogočajo nadzora nad premerom vlaken in nad njihovo medsebojno ureditvijo (5). Zato se na področju tkivnega inženirstva najpogosteje uporabljajo le prve tri metode, med njimi pa se je kot najbolj obetavna izkazala prav metoda elektrostatskega sukanja (6). Le-ta izvira iz postopka elektrostatskega razprševanja. Razlika med procesoma je zgolj v produktu, saj pri elektrostatskem sukanju nastanejo pretežno vlakna, pri elektrostatskem razprševanju pa v večji meri dobimo trdne polimerne

delce (7). Pri obeh postopkih uporabljamo isto elektrostatsko napravo, pri čemer moramo za nastanek vlaken in ne delcev oz. vozlov natančno optimizirati spremenljivke tehnološkega postopka (8). Kljub temu, da ima elektrostatsko sukanje že dolgo zgodovino (prvi patent se je pojavil leta 1902), je v široki uporabi šele zadnjih 5-10 let (5). Povečano zanimanje se je pojavilo, ko so ugotovili, da je s postopkom elektrostatskega sukanja v optimiziranih pogojih mogoče na preprost, prilagodljiv in poceni način izdelati izredno tanka vlakna s premerom v območju od 100 do 500 nm, pri čemer lahko uporabimo sintetične ali naravne polimere (9). NV, ki jih izdelamo s postopkom elektrostatskega sukanja, so lahko organizirana v obliki snopov ali pa naključno prepletena v obliki mreže, z izbiro polimerov z ustreznimi lastnostmi pa lahko nadzorujemo tudi njihov premer, razmerje med površino in volumenom, poroznost ter tako izdelamo vlakna za točno določen namen uporabe (8).

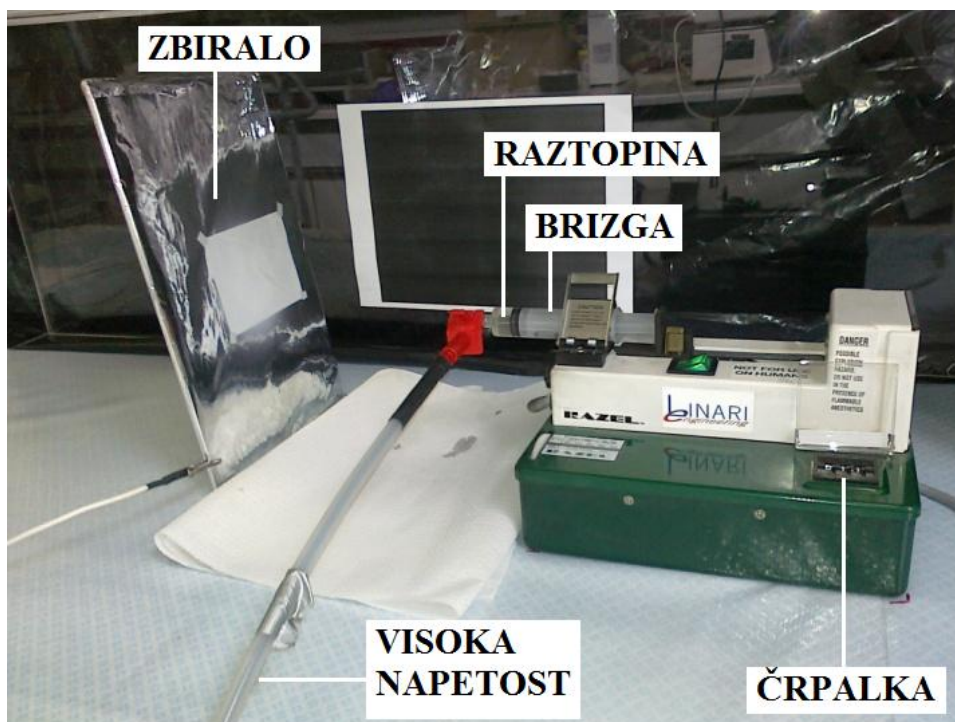
1.3. ELEKTROSTATSKO SUKANJE

Tipična naprava za elektrostatsko sukanje (sliki 1 in 2) je sestavljena iz:

- ~ šobe (igle), skozi katero potiskamo polimerno raztopino za izdelavo vlaken, tako da se na konici ustvari viseča kapljica;
- ~ zbirala, ki je ozemljeno in se vlakna na njem odlagajo;
- ~ izvora visoke napetosti (generatorja), ki med konico igle in zbiralom ustvari električno polje z jakostjo nekaj kV ter na polimerni raztopini ustvari naboj določene polarnosti, le-ta pa nato znotraj električnega polja pospeši curek proti nasprotno nabitem zbiralu;
- ~ črpalka, ki polimerno raztopino potiska skozi iglo s konstantnim pretokom (5).



Slika 1: Shematski prikaz elektrostatskega sukanja.



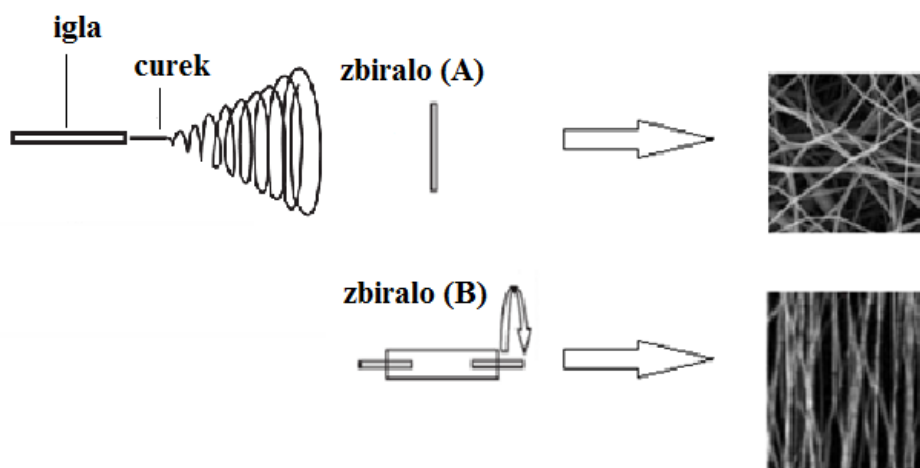
Slika 2: Naprava za elektrostatsko sukanje, ki smo jo uporabljali pri raziskovalnem delu.

Elektroda visoko napetostnega vira je priključena na kovinsko iglo in, ko generator prižgemo, v polimerni raztopini generiramo naboj določene polarnosti. S povečevanjem moči električnega polja se povečujejo elektrostatske odbojne sile med enako nabitimi polimernimi verigami in elektrostatske privlačne sile med nasprotno nabito polimerno raztopino in zbiralom (5). Posledično v polimerni raztopini pride do povečanja notranjih napetosti (nateznih sil), zaradi česar se viseča kapljica na konici igle začne podaljševati v obliko stožca, ki ga imenujemo tudi Taylorjev stožec (slika 1) (7). Ko napetost električnega polja preseže površinsko napetost tekočine, se iz stožca oblikuje nitast curek (8). Le-ta je zaradi naboja pospešen proti zbiralu, njegova pot pa ni ravna, pač pa je zaradi elektrostatskih odbojnih sil podvržena kaotičnemu gibanju (angl. »chaotic bending instability«) (7). Da bi se ta nestabilnost zmanjšala, pride do pojava plastičnega raztezanja polimera, zaradi česar se curek tanjša (3). V študijah razlagajo, da je nestabilno ovinkarjenje posledica elektrostatskih odbojnih sil, ki znotraj polimerne raztopine delujejo med enako nabitimi verigami polimera (10, 11). Obstaja nepotrjena hipoteza, ki pravi, da se s tanjšanjem nitastega curka na njem povečuje gostota naboja, zaradi česar se močno povečujejo tudi radialne odbojne sile. Ko je dosežena kritična gostota naboja, so odbojne sile že tako velike, da povzročijo cepitev nitastega curka (12). Rezultati raziskav skupine Sill in njegovih sodelavcev kažejo, da je hipoteza napačno postavljena (8). S hitrostno

kamero so posneli nestabilno območje nitastega curka in s pomočjo posnetkov ugotovili, da se iz ene viseče kapljice oblikuje le eno vlakno, ki se v električnem polju tako hitro upogiba in obrača, da ustvari vtis cepljenja curka (8).

1.3.1. Vrste zbiral

Pri izbiri zbiral so pomembni predvsem trije parametri: gibljivost zbiral, njegova prevodnost in geometrija. Gibljivost zbiral vpliva na medsebojno **urejenost vlaken** (3). Z uporabo stacionarnega zbiral (nepremična plošča, slika 3A) lahko izdelamo mrežo z naključno ureditvijo vlaken, po drugi strani pa lahko z uporabo vrtljivega zbiral (premično vreteno, slika 3B) izdelamo vlakna, ki so urejena v obliko snopa. Pri tem je hitrost vrtenja vretena zelo pomemben parameter, saj določa stopnjo anizotropnosti.



Slika 3: Shema različnih vrst zbiral.

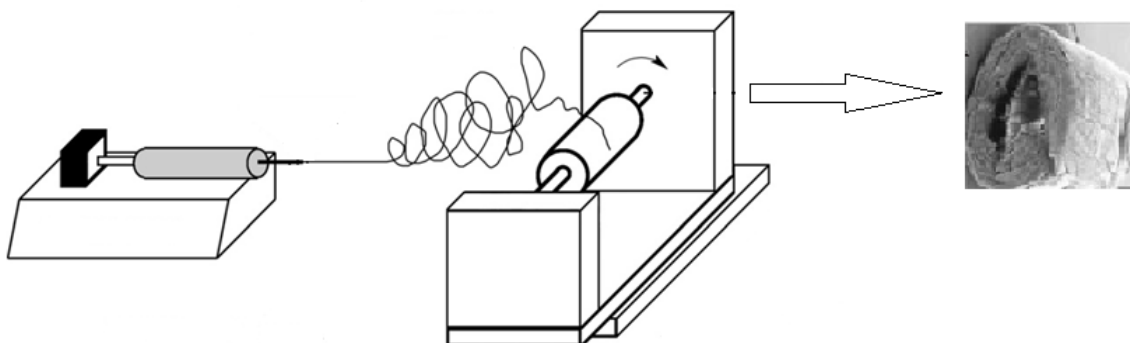
(A) stacionarno zbiralo (nepremična plošča), kjer izdelamo mrežo z naključno ureditvijo vlaken,

(B) vrtljivo zbiralo (premično vreteno), kjer izdelamo vlakna urejena v obliko snopa.

Poleg vpliva na urejenost NV lahko z izbiro zbiral vplivamo tudi na **velikost por med izdelanimi vlakni**. Pri tem igra pomembno vlogo prevodnost uporabljenega zbiral (8). Raziskovalci predvidevajo, da je dobro prevodno zbiralo (npr. aluminijasta folija, bakrena mreža) sposobno razpršiti rezidualni naboj na polimernih verigah, medtem ko pri uporabi slabo prevodnega zbiral (npr. papirja) do tega pojava ne pride in se posledično vlakna na zbiralu med seboj odbijajo. S tem se gostota vlaken na manj prevodnih zbiralih zmanjša in mreža NV vsebuje večje pore (8).

V nadaljnjih raziskavah so ugotovili še, da lahko z izbiro ustrezne geometrije zbiral vplivamo tudi na **obliko končnega produkta**. Pri uporabi dvodimenzionalne

bakrene mreže ima produkt obliko plošče oz. filma, če pa kot zbiralo uporabimo cilindrično premično vreteno, pa ima produkt tubularno strukturo (slika 4) (3).



Slika 4: Shema cilindričnega premičnega vretena.

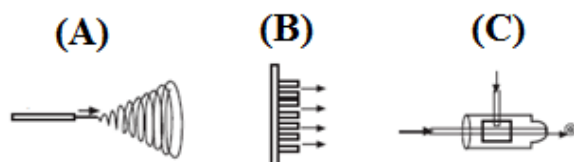
Ker se izdelana vlakna velikokrat dobro pritrdijo na zbiralo, na podlagi raziskav priporočajo uporabo posebnega poliuretanskega zbiralca Tegaderm™ (slika 5), s katerega je odstranitev NV veliko lažja (13).



Slika 5: Poliuretansko zbiralo Tegaderm™.

1.3.2. Vrste šob

Poleg zbiral lahko modificiramo tudi šobo, pri čemer lahko namesto brizge z iglo uporabimo različno oblikovane šobe. Tako lahko namesto sistema enojne šobe (slika 6A) uporabimo sistem multiplih šob (slika 6B), s pomočjo katerega se poveča hitrost izdelave vlaken, saj le-ta nastajajo iz več curkov hkrati (8). Poznamo še sistem z dvokanalno šobo (slika 6C), ki se uporablja za izdelavo obloženih vlaken (angl. »core-shell fibres«). To so NV, ki so izdelana iz dveh različnih raztopin, pri čemer ena tvori jedro, druga pa tvori oblogo vlakna. Na ta način lahko zdravilno učinkovino obložimo z določenim polimerom in jo tako zaščitimo pred pogoji okolja, hkrati pa lahko dosežemo tudi prirejeno sproščanje učinkovine (10).



Slika 6: Shema različnih vrst šob.

(A) enojna šoba (B) multipla šoba in (C) dvokanalna šoba.

1.4. SPREMENLJIVKE ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA

Na nastanek, morfologijo in premer vlaken vpliva veliko število različnih spremenljivk, ki jih lahko razdelimo v tri skupine. V prvo skupino uvrščamo **spremenljivke polimerne raztopine**: koncentracijo in molekulsko maso polimerov, viskoznost, površinsko napetost ter prevodnost polimerne raztopine (14). Vpliv posameznih spremenljivk na elektrostatsko sukanje težko nadzorujemo, saj so spremenljivke med seboj povezane, zato se sprememba enega parametra raztopine običajno odraža tudi kot sprememba drugega parametra (npr. s povečanjem molekulske mase polimera se hkrati poveča tudi viskoznost njegove raztopine) (8). V drugo skupino spadajo **spremenljivke tehnološkega postopka**: napetost električnega polja, pretok polimerne raztopine, razdalja med konico igle in zbiralom, vrsta in geometrija zbirala, premer igle (8, 15). V zadnjo skupino pa uvrščamo **spremenljivke okolja**, kot so temperatura in vlažnost okolja ter hitrost pretoka zraka (14, 15). Čeprav se je postopek elektrostatskega sukanja izkazal kot vsestranska in relativno poceni metoda za izdelavo polimernih vlaken mikro- in nanometrskih velikosti, pa prenos spremenljivk iz enega na drug sistem (npr. sprememba polimera) ni tako enostaven. Predhodne študije so pokazale, da se spremenljivke od sistema do sistema precej razlikujejo predvsem glede na to, kateri polimer uporabimo in v kakšnem topilu ga raztopimo (1, 8). Zato je pred izvajanjem postopka elektrostatskega sukanja potrebno najprej ovrednotiti spremenljivke polimerne raztopine, temu sledi določitev spremenljivk tehnološkega postopka, ki jih nato še optimiziramo in tako izdelamo lepo oblikovana vlakna z željenim premerom in brez vozlov.

1.4.1. SPREMENLJIVKE POLIMERNE RAZTOPINE

1.4.1.1. Koncentracija

Najpomembnejša spremenljivka polimerne raztopine je zagotovo njena koncentracija, saj le-ta odloča o izvedljivosti elektrostatskega sukanja in s tem omogoča/onemogoča nastanek NV (8). Ugotovili so, da pri zelo nizki koncentraciji polimerne raztopine nastanejo maloštevilna NV s številnimi vozli. Z večanjem koncentracije raztopine se oblika vozlov postopoma spreminja iz kroglaste v vretenasto in tako pri ustrezni koncentraciji dobimo enotno oblikovana vlakna (14). Polimerna raztopina mora torej vsebovati toliko polimera, da pride do prepletanja verig v NV, pri tem pa ne sme biti niti preveč razredčena niti preveč koncentrirana (8). Če je polimerna raztopina preveč razredčena, se polimerni curek preden doseže zbiralo prekine, na konici igle pa se začnejo pojavljati kapljice. Tako namesto NV dobimo pretežno vozle ali pa se na zbiralu pojavijo zgolj posušene polimerne kapljice (8, 14). Če je raztopina preveč koncentrirana, je zaradi prevelike viskoznosti ne bomo mogli potisniti skozi iglo, zato se ne bo oblikoval kontinuiran stabilen curek in vlakna spet ne bodo mogla nastati. Nadalje so proučevali še odnos med koncentracijo polimerne raztopine in premerom NV ter ugotovili, da se z večanjem koncentracije polimera večja tudi premer vlaken (8). Na podlagi vseh ugotovitev lahko zaključimo, da obstaja omejeno območje koncentracij polimera, znotraj katerega je mogoče polimerno raztopino elektrostatsko sukati v vlakna, pri čemer pa lahko vplivamo še na premer izdelanih vlaken.

1.4.1.2. Molekulska masa polimera

Molekulska masa je druga pomembna spremenljivka, ki preko vpliva na reološke lastnosti polimerne raztopine odloča o morfologiji in premeru izdelanih NV (14). Raziskovalci so ugotovili, da se pri elektrostatskem sukanju raztopin polimerov z nizko molekulsko maso na zbiralu pojavijo pretežno vozli, ne pa vlakna. Po drugi strani pa iz raztopin polimerov z visoko molekulsko maso nastanejo vlakna z velikim premerom. Molekulska masa polimera vpliva na število prepletov verig v polimerni raztopini in je tako posredno povezana z viskoznostjo polimerne raztopine (14). Z večanjem molekulske mase polimera se večja število prepletov verig in s tem tudi viskoznost polimerne raztopine pri enaki (m/m) koncentraciji, to pa vodi v izdelavo NV z velikim premerom in manj vozli (14).

1.4.1.3. Viskoznost

Tudi viskoznost polimerne raztopine pomembno vpliva na premer vlaken in na njihovo morfologijo. Ugotovili so, da pri elektrostatskem sukanju polimerne raztopine z zelo majhno viskoznostjo na konici igle ni mogoče ustvariti kontinuiranega nitastega curka, zaradi česar namesto NV nastanejo pretežno vozli (14). Po drugi strani je polimerno raztopino z zelo visoko viskoznostjo težko potisniti skozi ozko iglo, kar zopet onemogoča uspešno izvajanje elektrostatskega sukanja (8). Obstaja torej optimalno območje viskoznosti, znotraj katerega je polimerno raztopino mogoče elektrostatsko sukati v NV, pri čemer se je potrebno zavedati, da se interval optimalne viskoznosti od polimera do polimera razlikuje (8). Viskoznost, koncentracija in molekulska masa polimera so med seboj tesno povezane. Z večanjem koncentracije polimera ali njegove molekulske mase se hkrati večja še viskoznost polimerne raztopine, kar vodi v izdelavo bolj enotno oblikovanih vlaken z večjim povprečnim premerom (14).

1.4.1.4. Površinska napetost

Površinska napetost polimerne raztopine je prav tako zelo pomembna spremenljivka elektrostatskega sukanja, na katero v veliki meri vpliva predvsem sestava topila, v katerem so polimeri raztopljeni (14). Z nižanjem površinske napetosti polimerne raztopine je po podatkih raziskovalca Hohmana in njegovih sodelavcev mogoče izdelati vlakna z malo ali celo brez vozlov (16). Praviloma visoka površinska napetost polimerne raztopine moti proces elektrostatskega sukanja, saj se na konici igle ustvari nekontinuiran nitast curek, iz katerega se na zbiralu oblikujejo vozli ali pa se pojavijo zgolj posušene polimerne kapljice (14). Curek na konici igle se oblikuje takrat, ko elektrostatske sile znotraj generiranega električnega polja presežejo površinsko napetost polimerne raztopine (15). Nižja površinska napetost polimerne raztopine torej omogoča izvajanje elektrostatskega sukanja pri nižji napetosti električnega polja, zato je bolje uporabljati raztopine polimerov z nižjo površinsko napetostjo (14).

1.4.1.3. Prevodnost

Pred izdelavo NV s postopkom elektrostatskega sukanja je potrebno ovrednotiti tudi prevodnost polimerne raztopine, saj na nastanek nitastega curka močno vpliva število nabitih skupin na verigah polimerov (14). Na prevodnost polimerne raztopine lahko vplivamo z izbiro ustreznega polimera, ki ga raztopimo v primernem topilu (8). Ugotovili

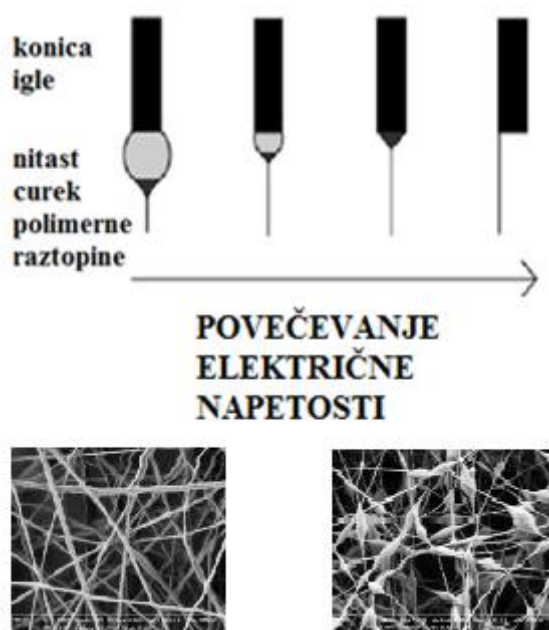
so, da se premer izdelanih vlaken manjša z večanjem prevodnosti polimerne raztopine (14). Takšne raztopine imajo večjo gostoto naboja, zato se po eni strani poveča moč elektrostatskih privlačnih sil, ki vleče curek proti zbiralu in ga tanjša, po drugi strani pa se poveča tudi moč elektrostatskih odbojnih sil med enako nabitimi verigami polimera, zaradi česar nastanejo tanjša vlakna (8). Ugotovili so, da so raztopine z izredno visoko prevodnostjo v močnem električnem polju zelo nestabilne, kar posledično vodi v večje ovinkarjenje nitastega curka in nastanek vlaken s široko porazdelitvijo premera (14). Do tega pojava pride, ker imajo polimerne raztopine z večjo prevodnostjo večjo kapaciteto za prenos naboja in posledično je curek raztopine med potovanjem v električnem polju izpostavljen večjim elektrostatskim silam kot pa curek polimerne raztopine z nižjo prevodnostjo (8). Večina naravnih polimerov je polielektrolitov, zato lahko z uporabo primerne topila pripravimo dobro prevodne polimerne raztopine, ki jih lahko elektrostatsko sukamo v NV. Kadar elektrostatsko sukanje zaradi slabše prevodnosti same polimerne raztopine ni mogoče, lahko raztopini dodamo soli in tako omogočimo elektrostatsko sukanje tudi slabše prevodnih polimerov (14). Vpliv dodatkov soli na morfologijo in premer NV je v svoji študiji skupaj s sodelavci proučeval raziskovalec Zhong. Ugotovil je, da je iz polimernih raztopin z dodanimi solmi kot so KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 oz. NaCl mogoče izdelati relativno tanka vlakna, ki v premeru merijo od 200 do 1000 nm in ne vsebujejo vozlov (17). Dodatek soli v polimerno raztopino vodi v nastanek NV z enotnejšo morfologijo, hkrati pa se zmanjša tudi število vozlov (14).

1.4.2. SPREMENLJIVKE TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA

1.4.2.1. Napetost električnega polja

Najpomembnejša spremenljivka tehnološkega postopka je prav gotovo napetost električnega polja, saj šele dosežena minimalna kritična napetost omogoča izvedljivost elektrostatskega sukanja. Dovolj visoka električna napetost vnese raztopini dovolj naboja, da se na konici igle oblikuje curek, ki v električnem polju pospešeno potuje proti ozemljenemu zbiralu (14). Z izbiro ustrezne jakosti priključene električne napetosti lahko vplivamo tako na premer vlaken kot tudi na vsebnost vozlov. O vplivu napetosti električnega polja na premer vlaken raziskovalci zaenkrat še nimajo enotnega mnenja. Renker in Chun sta ugotovila, da moč električnega polja nima velikega vpliva na premer vlaken (18). Za razliko od njiju so mnogi ugotovili, da se pri uporabi višje napetosti poveča masni pretok polimerne raztopine skozi iglo, zaradi česar pri elektrostatskem sukanju

nastanejo vlakna z večjim premerom (8). Po drugi strani mnogi poročajo, da se z večanjem priključene napetosti poveča moč električnega polja, v katerem je curek polimerne raztopine podvržen večjim elektrostatskim odbojnim silam. Zaradi tega se verige polimerov med seboj bolj odbijajo in na zbiralu se pojavijo vlakna z manjšim premerom (19). Nadalje, če je jakost električnega polja med konico igle in zbiralom neoptimalna (bodisi previsoka bodisi prenizka), je verjetnost za nastanek vozlov večja (14). Priključena električna napetost vpliva na obliko kapljice polimerne raztopine, iz katere nastane Taylorjev stožec in iz njega nitast curek (8). Pri nizki napetosti generatorja se stožec oblikuje na konici viseče kapljice (slika 7). Ko napetost višamo, se volumen viseče kapljice postopno zmanjšuje, zato se Taylorjev stožec oblikuje na točki vse bližje konici igle, kar pa vodi v nastanek vlaken z večjim številom vozlov (8). Torej zaključimo lahko, da za točno določen sistem polimer/topilo obstaja neko optimalno območje priključene napetosti, znotraj katerega lahko teoretično izdelamo vlakna brez vozlov.



Slika 7: Shematski prikaz vpliva električne napetosti na obliko kapljice polimerne raztopine in na morfologijo izdelanih NV.

1.4.2.2. Pretok polimerne raztopine

Pretok črpalke vpliva na hitrost potovanja polimerne raztopine skozi iglo in s tem na količino prenesenega materiala, iz katerega nastajajo vlakna (14). V primeru, da je pretok premajhen, se Taylorjev stožec na konici viseče kapljice ne more obdržati in tako ne dobimo kontinuiranega nitastega curka polimerne raztopine. S povečevanjem pretoka se vzporedno povečuje premer vlaken (8). S spreminjanjem pretoka črpalke lahko vplivamo

tudi na morfologijo vlaken in tako se pri zelo velikih pretokih na zbiralu pojavijo vlakna z veliko vsebnostjo vozlov in s številnimi polimernimi madeži (14). Pri prevelikih pretokih je čas potovanja nitastega curka od konice igle do zbiralu tako kratek, da topilo nima časa v celoti izhlapeti. Izdelana vlakna se pred odlaganjem na zbiralu ne posušijo, to pa je razlog za nastanek številnih vozlov in polimernih madežev (8, 14).

1.4.2.3. Razdalja med konico igle in zbiralom

Potrebno je omeniti še razdaljo med konico igle in zbiralom, saj le ta vpliva na premer vlaken in njihovo morfologijo (8). Dokazali so, da se s krajšanjem razdalje oblikujejo tanjša vlakna. Do takega zaključka je prišel raziskovalec Meng s sodelavci, ki so izdelovali NV iz zmesi hitosana ter kopolimera mlečne in glikolne kisline (PLGA), pa tudi Pham s sodelavci, ki so proučevali izdelavo sulfonskih NV (19, 20). Poleg tega so ugotovili še to, da se pri krajši razdalji med konico igle in zbiralom oblikujejo ploščata NV, pri daljši razdalji pa valjasta NV (8). Po drugi strani s krajšanjem razdalje med konico igle in zbiralom vlakna izgubijo svojo enotno morfologijo. Pojavljati se začnejo vozli, kar pripisujejo neuspešni odstranitvi topila, ki na tako kratki poti med konico igle in zbiralom ni uspelo popolnoma izhlapeti (8, 14).

1.4.3. SPREMENLJIVKE OKOLJA

Poleg spremenljivk polimerne raztopine in tehnološkega postopka ne smemo pozabiti tudi na temperaturo in vlažnost okolja, v katerem izvajamo elektrostatsko sukanje (8). Ugotovili so, da se pri povišani temperaturi okolja zaradi znižanja viskoznosti polimerne raztopine oblikujejo tanjša vlakna (14). Po drugi strani ima vlažnost okolja večji vpliv na hitrost izhlapevanja topila, v katerem je polimer raztopljen. Tako pri zelo majhni vlažnosti okolja topilo hitreje izhlapi (8). Včasih je hitrost izhlapevanja topila tako velika, da se polimerna raztopina posuši že na konci igle in jo zamaši ter tako onemogoči izvajanje elektrostatskega sukanja (14). Poleg tega vlažnost zraka vpliva tudi na poroznost mreže NV, ki se zberejo na zbiralu. Kadar je ozračje močno nasičeno z vlago, se naboj na površini NV zmanjša. Posledično se vlakna, odložena na zbiralu, med seboj manj odbijajo in tako so pore med njimi manjše (14). Na podlagi teh ugotovitev lahko zaključimo, da je za uspešno izdelavo NV s postopkom elektrostatskega sukanja potrebno natančno nadzorovati tudi temperaturo in vlažnost okolja.

1.5. UPORABA NANOVLAKEN

Z boljšim poznavanjem lastnosti NV se je v zadnjih letih njihova uporaba razširila na številna področja kemijske in tekstilne industrije, računalništva in informatike, transporta, energetike, še posebej pa na področje farmacevtske industrije in biomedicine (3). V zadnjem času so zelo aktualna polimerna NV, ki so izdelana s postopkom elektrostatskega sukanja. Takšna NV izkazujejo številne prednosti kot so velika specifična površina in praktično neomejena dolžina vlaken, z izbiro ustreznih spremenljivk polimerne raztopine in spremenljivk tehnološkega postopka pa lahko vplivamo celo na njihovo mehansko trdnost, morfologijo in na premer izdelanih vlaken (14). Tako lahko izdelamo specifična NV za različne namene uporabe. Zasledimo lahko, da se mreže, sestavljene iz polimernih NV, že uporabljajo za filtracijo zraka (imenujejo jih filtracijske membrane), za katalize in za imobilizacijo encimov, iz njih izdelujejo vojaška zaščitna oblačila, sanitetne blazinice, plenice, umetno usnje in še bi lahko naštevali (3, 14, 15). Med drugim se polimerna NV čedalje pogosteje raziskujejo za uporabo tudi na področju tkivnega inženirstva za izdelavo tkivnih nadomestkov in sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran, intenziven razvoj pa poteka tudi na področju njihove uporabe kot dostavnih sistemov za nadzorovano sproščanje učinkovin (14).

1.5.1. Nanovlakna kot ogrodja za uporabo na področju tkivnega inženirstva

Tkivno inženirstvo je hitro razvijajoče se interdisciplinarno področje, ki uporablja biološke in inženirske pristope za razvoj živih tkivnih ali organskih nadomestkov (21). Ti nadomestki omogočajo obnovo, vzdrževanje ali pa celo izboljšanje nekaterih funkcij človeških tkiv (21). Na tak način lahko dosežemo popolno vključitev nadomestka v organizem pacienta. Gojenje sesalskih celic v laboratorijskih pogojih (*in vitro*) je znano že več let, toda šele spoznanja zadnjih let na področjih fiziologije, celične in molekularne biologije so omogočila diferenciacijo in rast celic v obliki kompleksnih tridimenzionalnih struktur (21). Inženirsko načrtovana in vzgojena tkiva postajajo vse bolj uporabni izdelki v medicini, ki odpirajo nove možnosti terapij in so že v klinični uporabi (21). Ti trendi so najmočnejše izraženi v ZDA, saj so prvi izdelki s strani Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) že odobreni za uporabo.

V laboratorijih so tako najprej začeli vzgajati kožne nadomestke. Ta dosežek je pomenil revolucijo v medicini, saj je omogočil zdravljenje hudih opeklin in globokih ran, ki se slabo in dolgo časa celijo. Kožni nadomestek je v osnovi sestavljen iz celic

(keratinocitov, ki so glavni celični tip povrhnjice kože ali fibroblastov, ki so glavni celični tip usnjice kože) in ogrodja, na katerem se celice razmnožujejo (21). V telesu je zunajcelično ogrodje sestavljeno večinoma iz dveh vrst zunajceličnih molekul: proteoglikanov in strukturnih proteinov (kolagen, elastin, keratin, laminin, fibronektin, vitonektin itd.), ki so med seboj povezani v proteinska vlakna s premerom od 50 do 150 nm (1). Prekurzorji gradbenih enot proteinskih vlaken se sintetizirajo znotraj celic in se nato s procesom eksocitoze izločijo v zunajcelični prostor, kjer se encimsko preoblikujejo v vlakna (4). Le-ta zagotavljajo strukturno podporo in mehansko integriteto tkiva, poleg tega pa regulirajo celični odziv, saj vplivajo na obliko, proliferacijo, migracijo in diferenciacijo celic (21). Idealno ogrodje za celice mora tako čim boljše posnemati naravno zunajcelično ogrodje, kar pomeni, da mora zagotavljati mehansko podporo, vzdrževati normalno razmnoževanje celic, hkrati pa ne sme povzročati neželenih učinkov na okoliško tkivo (22).

Ker polimerna NV posnemajo strukturno in biološko funkcijo proteinskih vlaken naravnega zunajceličnega ogrodja, so zelo aktualna za uporabo na področju tkivnega inženirstva (14). V zadnjih letih se za izdelavo NV kot ogrodij kožnih nadomestkov najpogosteje uporablja postopek elektrostatskega sukanja (21). Le-ta omogoča izdelavo NV iz **naravnih polimerov**, ki so biokompatibilni (npr. hitosan, alginat, želatina, fibroin) ali pa so že sami prisotni v naravnem zunajceličnem ogrođu kože (npr. kolagen, hialuronska kislina, keratin, elastin). Postopek omogoča tudi izdelavo vlaken iz zmesi naravnih in sinteznih polimerov. Takšna NV imajo zaradi naravnega polimera izboljšane biokompatibilne lastnosti, zaradi sinteznega polimera pa tudi dobre mehanske lastnosti (14). V študijah opisujejo, da je s postopkom elektrostatskega sukanja mogoče izdelati polimerna NV, ki v **premeru, urejenosti in topografiji** posnemajo naravno zunajcelično ogrodje, in tako spodbujajo celično razmnoževanje in povezovanje celic med seboj (8, 21). Polimerna NV imajo podobno kot proteinska vlakna naravnega zunajceličnega ogrodja **veliko specifično površino**, s katero lahko vstopajo v stik s celicami in tako pripomorejo k pritrditvi celic na podlago. Med posameznimi vlakni so tudi **številne pore**, ki olajšajo transport hranilnih snovi do celic, hkrati pa omogočajo vraščanje celic in tvorbo novih žilnih povezav (angiogenezo), zaradi česar se tkivni nadomestek lahko uspešno vraste v okoliško nepoškodovano tkivo (8). S skrbno načrtovano izdelavo vlaken iz biorazgradljivih polimerov lahko izdelamo celo takšno ogrodje, ki se s postopno razgradnjo polimera dinamično spreminja, celice se medtem počasi vraščajo v tkivni nadomestek in so po

določenem času sposobne same izdelovati lastna vlakna zunajceličnega ogrodja (13). Na tak način lahko polimerna NV pomembno prispevajo k obnavljanju, vzdrževanju in izboljševanju funkcij poškodovanega npr. kožnega tkiva (1).

1.5.2. Sodobne obloge za pospešeno celjenje ran

Sodobne obloge za celjenje ran predstavljajo nadomestek manjkajočega tkiva. Idealna obloga mora ustrezno pripraviti ležišče rane, jo zaščititi pred sekundarno infekcijo in hkrati omogočati izmenjavo plinov (23). Obenem mora absorbirati presežek izločkov, vendar rane ne sme izsušiti. Omogočati mora tudi manj pogosto in neboleče prevezovanje, kar pomeni, da se ne sme pritrditi na rano, mora pa se pritrditi na zdravo tkivo, pri čemer mora biti odstranjevanje obloge enostavno (24). Ker je s postopkom elektrostatskega sukanja mogoče izdelati polimerna vlakna iz materialov, ki so biokompatibilni in spodbujajo rast fibroblastov ter keratinocitov, so se mreže NV začele intenzivno proučevati kot sestavine sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran. Raziskovalec Rho je skupaj s sodelavci raziskoval, kako kolagenska vlakna, izdelana s postopkom elektrostatskega sukanja, vplivajo na celjenje ran pri miškah. Prišel je do ugotovitve, da se rana hitreje zaceli, ko nanjo položimo sodobno oblogo iz mreže kolagenskih NV, kot pa če bi uporabili klasično gazo (22). V podobni študiji so ugotovili tudi, da vlakna, ki vsebujejo večje količine hitosana, izkazujejo večjo hemostatsko aktivnost (6). Zdravljenje s takimi sodobnimi oblogami bi bilo bistveno hitrejše, izboljšala bi se kakovost bolnikovega življenja, celokupni stroški zdravljenja pa bi se zaradi krajšega zdravljenja zmanjšali, čeprav so sodobni materiali dražji od klasične gaze (25).

1.5.3. Dostavni sistemi za nadzorovano sproščanje učinkovin

Z vgraditvijo učinkovine v vlakna iz biokompatibilnega in biorazgradljivega polimera lahko izdelamo dostavni sistem, ki bo z določeno hitrostjo vgrajeno učinkovino nadzorovano sproščal (14). Hitrost sproščanja vgrajene učinkovine je odvisna od specifične površine vlakna, ki je v stiku s topilom, in od polimera, iz katerega je vlakno narejeno (10). Metoda elektrostatskega sukanja omogoča izdelavo vlaken iz številnih polimerov, ki imajo različno hitrost razpletanja verig in posledično različno hitrost razgradnje, s tem pa omogočajo bodisi hitro ali pa zakasnjeno sproščanje vgrajene učinkovine (14). Učinkovino lahko v vlakna vgradimo na več načinov. Lahko jo raztopimo v polimerni raztopini in iz nje s postopkom elektrostatskega sukanja z običajnim sistemom

enojne šobe izdelamo NV (26). Tako lahko v vlakna odvisno od njihove sestave vgradimo učinkovine, ki izkazujejo lipofilen značaj (npr. ibuprofen, cefazolin, rifampin, paklitaksel, itrakonazol) ali pa hidrofilne lastnosti (npr. mefoksin, tetraciklin) (14). Po drugi strani zasledimo veliko manj raziskav, kjer raziskovalci poročajo o uspešnem vgrajevanju biomakromolekul kot so proteini, DNA ali RNA (27). Za izdelavo dostavnega sistema se običajno uporablja sistem dvokanalnih šob, ki omogoča izdelavo obloženih NV (10). Na tak način lahko vgradimo celo dve inkompatibilni učinkovini. To naredimo tako, da eno učinkovino raztopimo skupaj s polimerom, ki tvori jedro, drugo pa s polimerom, ki sestavlja oblogo in se na tak način izognemo interakcijam, ki bi se pojavile med samima učinkovinama.

1.6. POLIMERI ZA IZDELAVO NANOVLAKEN

Raziskovalci so odkrili široko paleto polimerov, ki jih je mogoče elektrostatsko sukati in tako iz njih izdelati NV. Poročajo o uspešni izdelavi NV iz naravnih polimerov, sinteznih polimerov in iz njihovih zmesi (14). Izbira polimera je v največji meri odvisna od namena uporabe NV. Za uporabo v biomedicini so primerni polimeri, ki so s tkivi kompatibilni in hkrati njihovi razgradni produkti niso toksični. Najprimernejši so tisti polimeri, ki jih najdemo v naravnem zunajceličnem ogrodju, saj predstavljajo naravno okolje za celično preživetje, pritrjanje, proliferacijo in diferenciacijo. Imenujemo jih tudi biofunkcionalni polimeri (4). Pri izbiri ustreznih polimerov se moramo zavedati, da imajo tako naravni kot sintezni polimeri določene prednosti in pomanjkljivosti (8). Slabost naravnih polimerov je delna denaturacija (izguba konformacije) polimernih verig in slabe mehanske lastnosti iz njih izdelanih NV (trdnost, viskoelastičnost) (14). Po drugi strani pa je slabost NV iz sinteznih polimerov, da ne posnemajo tako dobro naravnega zunajceličnega ogrodja. Iz tega razloga je smiselna izdelava NV iz zmesi dveh polimerov različnega izvora, kar vodi v izdelavo vlaken z dobrimi mehanskimi in biomimetičnimi lastnostmi (8). Na področju tkivnega inženirstava se med polimeri naravnega izvora najpogosteje uporabljajo kolagen, hitosan, hitin, hialuronska kislina, želatina, kasein, celulozni acetat, protein svile in fibrinogen, medtem ko se med biorazgradljivimi polimeri sinteznega izvora najpogosteje uporabljajo poli- ϵ -kaprolakton (PCL), polimlečna kislina (PLA), poliglikolikolna kislina (PGA), kopolimer mlečne in glikolne kisline (PLGA) ter kopolimer mlečne kisline in ϵ -kaprolaktona [P(LLA-CL)] (14). Kljub določenim slabostim

pa so naravni polimeri na področju biomedicine še vedno bolj zaželeni kot tisti sinteznega izvora (15).

Glede na dosedanje raziskave se na področju tkivnega inženirstva največje zanimanje kaže za uporabo kolagena, ki je del naravnega zunajceličnega ogrodja in tako spada med najbolj razširjene proteine v telesu (22). NV iz kolagena tipa I, II in III lahko tkivu nudijo ustrezno mehansko podporo, zaradi česar jih mnogi obravnavajo kot idealna vlakna za izdelavo tkivnih nadomestkov (14). Čeprav je mogoče izdelati kolagenska vlakna s premerom od 100 nm do nekaj μm , se kolagen v izdelavi NV zaradi težke dostopnosti materiala ni uveljavil (15). Tako sta ga v veliki meri nadomestila hitin in njegov derivat hitosan. Hitin je sestavljen iz N-acetilglukozaminskih enot in je za celulozo drugi najbolj razširjen polisaharid v naravi. Najdemo ga v oklepih rakov ter pri nekaterih insektih in gobah (6). Pogosto se pojavlja v sodobnih oblogah za rane, saj preko vzpodbujanja funkcije fibroblastov, ki sintetizirajo kolagenska vlakna, pospeši celjenje ran (25). Poleg tega je biokompatibilen, biorazgradljiv, zadržuje vlago in deluje protimikrobno, kar še dodatno prispeva k hitrejši obnovitvi poškodovanega kožnega tkiva (28). Najpomembnejši deacetiliran derivat hitina je hitosan, ki je tudi biorazgradljiv, biokompatibilen in neimunogen. Ker spada med polimere kationskega tipa, je topen le v kislih raztopinah, pri čemer na njegovo topnost v vodnih raztopinah vpliva tudi stopnja deacetiliranja (6). Ker ima bakteriostatične in fungistatične lastnosti, hkrati pa vzpodbuja proces hemostaze in zavira prenos bolečine v možgane, se podobno kot hitin pogosto uporablja za izdelavo sodobnih oblog za rane, kjer pospešuje normalno regeneracijo kožnega tkiva in s tem omogoča hitrejšo celjenje ran (25, 23). Po drugi strani je uporaba hitosana razširjena tudi na področju tkivnega inženirstva za izdelavo tkivnih nadomestov, saj so dokazali, da se celice določenega tipa na hitosanska NV dobro pritrjujejo (28).

Pri izdelavi dostavnih sistemov za nadzorovano sproščanje učinkovin se pogosteje uporabljajo NV iz polimerov sinteznega izvora, npr: polivinilalkohola (PVA), poli- ϵ -kapolaktona (PCL), kopolimera mlečne in glikole kisline (PLGA) itd. PVA spada med hidrofilne polimere z zelo dobro kemično in termično stabilnostjo. Poleg tega so dokazali, da je biokompatibilen in ne povzroča toksičnih učinkov (29). Tudi PCL je dokazano biokompatibilen, poleg tega pa še biorazgradljiv polimer in, ker je varnost njegove uporabe potrdila tudi FDA, ga čedalje bolj pogosto uporabljajo tudi na drugih medicinskih in farmacevtskih področjih (13).

Kljub velikemu obsegu raziskovalnega dela na področju izdelave NV tako na osnovi naravnih kot tudi sinteznih polimerov pa ostaja še veliko neznank, ki jih je potrebno preučiti, da bodo NV primerna za *in vivo* uporabo (1). Kot primer navajajo izdelavo NV iz zmesi hitosana in polietilenoksida (PEO). Čeprav PEO spada med splošno sprejete biokompatibilne polimere in ga po mnenju Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) uvrščamo v tisto skupino redkih sinteznih polimerov, katerih uporaba je dovoljena v farmacevtske, kozmetične in prehranske namene, pa mnogi vidijo slabost v tem, da vlakna zaradi vodotopnosti PEO v vodnem okolju in torej tudi v človeškem telesu hitro izgubijo strukturno integriteto (15). Na področju tkivnega inženirstva ali remodeliranja to ni sprejemljivo. Tu vlakna služijo kot ogrodje, na katerega se celice pritrjujejo in na njem razmnožujejo, zato je ohranitev njihove mehanske integritete po stiku z biološkim okoljem ključnega pomena (1). Tako je v tkivnem inženirstvu zaželeno, da NV, izdelana iz zmesi hitosana in PEO, v svoji strukturi vsebujejo kar se da visok delež hitosana, saj je le tako mogoče izdelati ogrodje, ki bo tudi v vodnem okolju ohranilo svojo strukturno integriteto.

1.7. TOPILA ZA IZDELAVO NANOVLAKEN

Izbira ustreznega topila je prvi in ključni korak, ki odločilno vpliva na izvedljivost elektrostatskega sukanja polimerne raztopine. Pri elektrostatskem sukanju ima topilo več pomembnih nalog: po eni strani mora biti polimer v topilu dobro topen, tako da ga topilo v raztopljeni obliki prenese do zbirala, po drugi strani pa mora topilo vzdrževati tudi integriteto same polimerne raztopine (14). Pri elektrostatskem sukanju se najpogosteje uporabljajo naslednja topila: očetna kislina, etanol, metanojska kislina, metanol, aceton, dimetilformamid, tetrahidrofuran, diklorometan, kloroform, trifluoroetanol, trifluoroocetna kislina (14).

Pri izbiri topila moramo biti pozorni na njegovo hlapnost in površinsko napetost. Topilo mora biti dovolj hlapno, da bo na poti med konico igle in zbiralom v celoti izhlapelo in se bodo na zbiralo odložila suha vlakna (8). Ugotovili so, da izhlapevanje topila vpliva na obliko vlaken in poroznost njihove površine. Slabo posušena vlakna imajo na zbiralu obliko traku, za razliko od dobro posušenih vlaken, ki so valjaste oblike (8). Raziskovalec Megelski je skupaj s sodelavci proučeval strukturne lastnosti polistirenskih vlaken, pri čemer je izbrani polimer raztapljal v zmesih z različnim razmerjem tetrahidrofurana (THF) in dimetilformamida (DMF). Tako je iz raztopin, kjer je kot topilo uporabil 100 % DMF (manj hlapno topilo) dobil gladka vlakna z manjšo specifično

površino kot v primeru, ko je vlakna izdelal iz raztopin, kjer je kot topilo uporabil 100 % THF (dobro hlapno topilo) in so imela NV veliko gostoto por na površini (30). Poleg ustrezne hlapnosti mora topilo imeti tudi ustrezno površinsko napetost. Ugotovili so namreč, da na površinsko napetost polimerne raztopine, iz katere bomo s postopkom elektrostatskega sukanja izdelovali vlakna, v največji meri vpliva ravno površinska napetost izbranega topila, medtem ko je vpliv koncentracije polimera zanemarljivo majhen. Tako lahko z raztapljanjem polimera v topilu z nizko površinsko napetostjo pripravimo polimerno raztopino z nizko površinsko napetostjo, iz nje pa s postopkom elektrostatskega sukanja NV brez vozlov (12). Poleg tega ima topilo velik vpliv tudi na premer vlaken. Geng je v svojem raziskovalnem delu skupaj s sodelavci ugotovil, da pri raztapljanju hitosana v bolj koncentrirani očetni kislini nastane polimerna raztopina z nižjo površinsko napetostjo kot v primeru manj koncentrirane očetne kisline, in da je iz raztopine z nižjo površinsko napetostjo s postopkom elektrostatskega sukanja mogoče izdelati tanjša hitosanska NV kot pa iz raztopine z višjo površinsko napetostjo (31).

1.8. IZDELAVA HITOSANSKIH NANOVLAKEN

V zadnjem času je bilo izvedenih kar nekaj raziskav, v katerih so iz hitosanskih raztopin s postopkom elektrostatskega sukanja izdelali NV (9). Poročajo o izdelavi hitosanskih NV s povprečnim premerom 330 nm, pa tudi o uspešni izdelavi NV iz zmesi hitosana in PVA s premerom vlaken v nanometrskem območju od 220 do 650 nm (9). V nedavni študiji so v raztopino poleg hitosana kot dodaten polimer uvedli še PEO, kar je omogočilo izdelavo izredno tankih NV s premerom v območju od 80 do 180 nm. Ugotovili so tudi, da je izvedljivost elektrostatskega sukanja hitosanskih raztopin močno odvisna od razmerja med polimeroma v zmesi (9, 21).

Elektrostatsko sukanje raztopine čistega hitosana je zelo težaven proces, saj ima sam polimer **nehomogeno sestavo** in **široko porazdelitev molekulske mase**, kar je posledica naravnega izvora polimera (15, 21). V raziskavi Bhattaraija in njegovih sodelavcev zasledimo tudi podatek, da se pri elektrostatskem sukanju raztopine čistega hitosana **z zelo nizko koncentracijo polimera**, tj. 2 % (m/m) ali manj, curek raztopine prekine še preden le-ta doseže zbiralo, zato se pojavijo zgolj kapljice (9). S povečevanjem koncentracije polimera v raztopini se število povezav med verigami hitosanskih molekul hitro povečuje in doseže kritično točko, kjer nastane tridimenzionalna mrežasta gelska struktura. Tako so raztopine čistega hitosana **z visoko koncentracijo polimera**, tj. 2 %

(m/m) ali več, previskozne, da bi jih lahko potisnili skozi iglo. Podobno kot v prejšnji situaciji tudi v tem primeru ne moremo izdelati vlaken, saj ne nastane kontinuiran curek s konstantnim pretokom polimerne raztopine (1). Viskoznost polimerne raztopine je odraz inter- in intramolekularnih povezav med polimernimi verigami (9). Tako je velika viskoznost vodnih raztopin hitosana posledica močnih vodikovih vezi med $-NH_2$ in $-OH$ funkcionalnimi skupinami, ki se nahajajo na površini hitosanskih verig (15). Naslednjo težavo predstavlja **majhna topnost** hitosana v vodi, kar lahko premostimo z uporabo ustreznega topila, najpogosteje z uporabo npr. očetne kisline, trifluoroocetne kisline ali pa diklorometana (21). Tako poročajo o uspešni izdelavi vlaken iz hitosana, ki so ga raztopili v zelo koncentrirani očetni kislini in izdelali vlakna s premerom 130 nm, pri uporabi organskega topila pa so dobili vlakna s širšo porazdelitvijo premera, in sicer od 60 do 330 nm (4). Težave pri izdelavi hitosanskih NV se pojavijo tudi zaradi izredno **visoke prevodnosti** njegovih raztopin v kislem mediju. Hitosan ima proste $-NH_2$ skupine, ki so v mediju z nizkim pH v protonirani obliki in tako povečajo ionsko gostoto v curku, da postopek elektrostatskega sukanja polimerne raztopine čistega hitosana ni izvedljiv. Zaradi močnih elektrostatskih odbojnih sil, ki v električnem polju delujejo med enako nabitimi verigami polimera, postane ovinkarjenje nitastega curka tako intenzivno, da do nastanka vlaken ne pride. Za rešitev opisane težave mnogi raziskovalci predlagajo dodatek PEO k raztopini hitosana. PEO naj bi se preko vodikovih vezi povezoval s hitosanom in s tem znižal prevodnost hitosanskih raztopin ter tako omogočil nastanek kontinuiranega nitastega curka raztopine polimerne zmesi (25). Po drugi strani pa naj bi dodatek PEO v hitosansko raztopino dodatno znižal še viskoznost raztopine polimerne zmesi ter omogočil elektrostatsko sukaje raztopin z višjo koncentracijo polimera (1).

1.9. IN VITRO BIOLOŠKO VREDNOTENJE

Za uporabo NV v *in vivo* okolju je bistveno poznavanje njihovega vpliva na celice, ki ga lahko delno ovrednostimo s poskusi *in vitro* na celičnih linijah. Da bi razumeli, kako specifična NV vplivajo na obnašanje celic, je potrebno spremljati njihovo morfolologijo, pritrjanje na podlago, proliferacijo, gostoto, medsebojno ureditev celic itd. (4). Znano je, da ima na celično morfolologijo največji vpliv substrat, na katerega je celica pritrjena. Tako poročajo o vretenasti morfolologiji celic, ki rastejo na ravni podlagi in o kroglasti morfolologiji celic, ki rastejo na mreži NV (32). Poleg tega so ugotovili, da celice med gojenjem lahko pridobijo podolgovato obliko, ko znotraj mreže NV rastejo vzporedno z vlakni (4). Pri

izdelavi tkivnih nadomestkov je zelo pomembno, da se celice takoj pritrdijo na ogrodje, še bolje pa je, če se v ogrodje vključijo in znotraj njega razmnožujejo. Dokaz pritrditve so izrastki iz celic oz. filopodiji (4). V študijah pritrditve celic na različne podlage zasledimo različne rezultate, a večina raziskovalcev poroča o izboljšanem pritrditvi različnih vrst celic na mreže NV v primerjavi z ravno površino. Tako je raziskovalec Liu skupaj s sodelavci opazil, da so imeli fibroblasti, ki so jih gojili na mreži NV iz polimetilmetakrilata (PMMA), veliko več izrastkov, kot pa tisti, ki so jih gojili na ravni stekleni površini (33). Po drugi strani Sangsanoh v svoji študiji razlik med keratinociti, ki so rastle na hitosanskih NV, in tistimi, ki so rastle na stekleni podlagi, ni opazil. Tako na NV kot tudi na stekleni podlagi je na celicah že po 8 urah inkubacije opazil številne izrastke. Do razlik je prišlo šele po petih dneh gojenja, saj so se celice na NV začele preraščati in oblikoval se je večplastni tridimenzionalni celični konstrukt (21). Dokazano je tudi, da nanotopografija vlaken vpliva na proliferacijo celic (4). Spodbujanje proliferacije keratinocitov in fibroblastov je bistvenega pomena pri oblikovanju sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran pa tudi pri izdelavi kožnih nadomestkov. O pospešeni proliferaciji poroča raziskovalec Chen, ki je skupaj s sodelavci dokazal, da se fibroblasti na NV iz zmesi hitosana in kolagena hitro razmnožujejo (25). Tudi Chong je v svojem raziskovalnem delu dokazal pospešeno proliferacijo fibroblastov na mreži NV, ki so bila izdelana iz zmesi PCL in želatine. S tem sta oba pomembno prispevala k razvoju novih, izboljšanih oblog, ki omogočajo hitrejše celjenje kožnih poškodb (13).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je s postopkom elektrostatskega sukanja izdelati hitosanska NV, ki bi bila primerna za izdelavo kožnih nadomestkov ali sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran. Ker je elektrostatsko sukanje same hitosanske raztopine zelo težaven proces, bomo poleg hitosana uporabili še dodaten polimer PEO. V raziskavi bomo uporabljali vedno isti PEO in tri različne vrste hitosana: hitosan nizke molekulske mase (LMW Hit), hitosan srednje molekulske mase (MMW Hit) in hitosan nizke viskoznosti (LV Hit). Tako hitosan kot tudi PEO bomo raztopili bodisi v 3 % bodisi v 30 % očetni kislini.

Prvi cilj naloge bo ovrednotiti spremenljivke polimernih raztopin, kar pomeni, da bomo raztopinam z različnim razmerjem Hit/PEO izmerili prevodnost, površinsko napetost in viskoznost. Glede na dobljene rezultate bomo nato določili spremenljivke tehnološkega postopka, tj. razdaljo med konico igle in zbiralom, napetost električnega polja in pretok črpalke, pri katerih se bo na konici igle oblikoval stabilen, kontinuiran curek. S tem namreč vplivamo na morfologijo in povprečni premer NV.

Drugi cilj naloge bo s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije (SEM mikroskopija) ovrednotiti morfologijo NV takoj po izdelavi in po spiranju z etanolom in PBS. S tem bomo preučili njihovo obnašanje v vodnem oz. celičnem mediju (ohranitev integritete NV), kjer se bo odvijalo *in vitro* vrednotenje na celični liniji. S pomočjo računalniškega programa ImageJ bomo določili še povprečni premer NV in tako preučili odnos med premerom vlaken in njihovo sestavo.

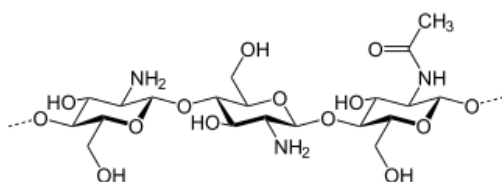
Tretji cilj naloge bo *in vitro* ovrednotiti biološki odziv celične linije keratinocitov na sam material, iz katerega so NV izdelana, in obenem ugotoviti, kakšen je odziv keratinocitov na nanotopografijo NV. V ta namen bomo s pomočjo invertne svetlobne in fluorescenčne mikroskopije opazovali morfologijo celic in njihovo pritrjanje na podlago. Primerjali bomo gostoto keratinocitov, ki rastejo na NV, z gostoto keratinocitov, ki rastejo na praznem krovnem stekelcu in tako ovrednotili rast keratinocitov na NV. Pozorni bomo tudi na način celične rasti, kjer bomo opazovali, ali keratinociti rastejo posamično ali v skupkih. Z MTS testom pa bomo nazadnje preverili še metabolno aktivnost oz. posredno proliferacijo celic, saj je le-ta bistvenega pomena za uporabo NV *in vivo*.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1. IZDELAVA NANOVLAKEN

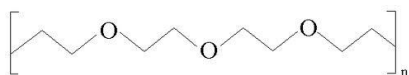
3.1.1. MATERIALI

- ~ Hitosan nizke molekulske mase (50-190 kDa), poli (D-glukozamin) deacetiliran hitin (75-85%), Aldrich Chemistry (Sigma-Aldrich), ZDA;
- ~ Hitosan srednje molekulske mase (190-310 kDa), poli (D-glukozamin) deacetiliran hitin (75-85%), Aldrich Chemistry (Sigma-Aldrich), ZDA;
- ~ Hitosan nizke viskoznosti iz lupine kozic, Sigma Life Science, Biochemika, ZDA (slika 8);



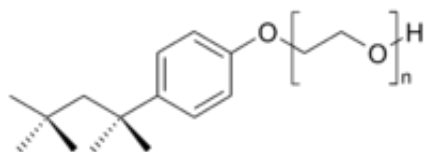
Slika 8: Kemijska struktura hitosana.

- ~ Polietilenoksid, inhibiran z 200-250 ppm BHT (butil hidroksitoluen), povprečna molekulska masa 900 000, Aldrich Chemistry (Sigma-Aldrich), ZDA (slika 9);



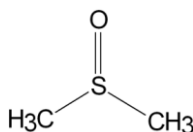
Slika 9: Kemijska struktura PEO.

- ~ Triton X-100TM, za uporabo v molekularni biologiji, biološko preizkušen, Aldrich Chemistry (Sigma-Aldrich), ZDA (slika 10);



Slika 10: Kemijska struktura Triton X-100.

- ~ Dimetilsulfoksid (DMSO), topilo za visoko tekočinsko kromatografijo, Aldrich Chemistry (Sigma-Aldrich), ZDA (slika 11);



Slika 11: Kemijska struktura DMSO.

- ~ Ocetna kislina 100 % (ledoct), Merck KgaA, Nemčija;
- ~ Etanol 96 %, PharmaChem, Ph. Eur. 5.0., vsebnost etanola: 95,1-96,9 % (v/v), Nemčija ;
- ~ priprava fosfatne pufrske raztopine (PBS): v 1 L prečiščene vode smo natehtali 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ in s pomočjo HCl uravnali pH na 7,4.

3.1.2. NAPRAVE

3.1.2.1. Priprava polimernih raztopin

Tehtanje prahov in mešanje raztopin je poteklo na naslednjih napravah:

- ~ analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica;
- ~ digitalna tehtnica, Sartorius BP310S, Göttingen, Nemčija;
- ~ magnetno mešalo, Ika Werke RO 15, New Jersey, ZDA.

3.1.2.2. Vrednotenje spremenljivk polimerne raztopine

Pri vrednotenju smo uporabili za:

- ~ merjenje pH: pH meter, MA 234, Seven Multi, Mettler Toledo, pH/Ion Analyzer, Schwerzenbach, Švica; pH indikatorske lističe (Acilit, ph 0-6), Merck, Nemčija;
- ~ merjenje viskoznosti: oscilacijsko rotacijski viskozimeter Rheolab MCR 301, Paar Physica, Stuttgart, Nemčija; merilni sistem stožec ploščica CP50-2 (Del. No. 80166481, D:50 mm, kot 2°) ; termostat Viscotherm VT 10, Pysica, Sttutgart, Nemčija; osebni računalnik;
- ~ merjenje prevodnosti: Conductivity meter, Ma 5964, Iskra, Slovenija;
- ~ merjenje površinske napetosti: Proccessor Tensiometer K12, verzija 5.05, Krüss GMBH, Nemčija.

3.1.2.3. Izdelava in spiranje nanovlaken

Pri izdelavi NV smo uporabljali:

- ~ 20 mL brizgo, B-Braunn, ZDA;
- ~ kovinsko iglo z notranjim premerom 0,8 mm, Linari Engineering, Italija;
- ~ črpalko, Razel TM, Ma R-99E, Italija;
- ~ izvor visoke napetosti, Linari Engineering s.r.l., Ma. P60-R-EU, Italija;

- ~ aluminijasto folijo,
- ~ gazo,
- ~ TegadermTM Contact 3M Health Care, Neuss, Nemčija;
- ~ velika krovna stekelca (22x22 mm);
- ~ mala krovna stekelca (2r = 5 mm).

3.1.2.4. Vrednotenje izdelanih nanovlaken

Pri vrednotenju morfologije posušenih in spranih NV ter njihovega premera smo si pomagali z :

- ~ bojestranskim lepilnim prevodnim trakom, premer 12 mm, Oxon, Oxford instruments, Velika Britanija;
- ~ vrstičnim ali 'scanning' elektronskim mikroskopom (SEM mikroskop) s pospeševalno napetostjo 1 kV, SEM Supra 35 VP, Oberkochen, Zeiss, Nemčija;
- ~ računalniškimi programi ImageJ, Image Processing and Analyzing in Java, 1.44p, NIM, ZDA;

3.1.3. METODE

3.1.3.1. Priprava polimernih raztopin

Ločeno smo pripravili 2 % (m/v) raztopino hitosana (LMW Hit ali MMW Hit ali LMW/LV Hit v razmerju 1:1) in 3 % (m/v) raztopino PEO v 3 % oz. 30 % (v/v) vodni raztopini očetne kisline. Na magnetnem mešalu smo v erlenmajericah nato raztopini pomešali v različnih (v/v) razmerjih Hit/PEO (100/0, 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40). Po 5 h mešanja na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi smo raztopinam dodali Triton X-100TM in DMSO v taki količini, da je bila končna koncentracija Triton X-100TM v raztopini 0,3 % (v/v) in končna koncentracija DMSO 10 % (v/v). Za merjenje viskoznosti, površinske napetosti in prevodnosti smo pripravili raztopine enakih razmerij (v/v) Hit/PEO, le da jim DMSO in Triton X-100TM nismo dodali.

3.1.3.2. Vrednotenje spremenljivk polimerne raztopine

Pred izdelavo NV smo ovrednotili spremenljivke raztopin polimernih zmesi Hit/PEO in se pri tem osredotočili na:

- ~ pH: Izmerili smo pH raztopin polimernih zmesi z različnimi (v/v) razmerji Hit/PEO v 30 % in 3 % vodni raztopini očetne kisline. Meritve so potekale pri sobni temperaturi.
- ~ viskoznost: Pripravili smo polimerne zmesi različnih (v/v) razmerij Hit/PEO z in brez DMSO in Triton X-100TM in jim viskoznost kontinuirano merili 1 teden v šestih časovnih točkah (5 h, 19-22 h, 27 h, 51 h, 75 h, 243 h). Prvo meritev smo vedno opravili po 5 h mešanja, tik preden smo dodali DMSO in Triton X-100TM, zadnjo pa po 1 tednu (275 h). Med meritvami so se vzorci mešali (med časovnimi točkami od 5 do 75 h) ali pa so bili spravljani v hladilniku (med zadnjima časovnima točkama, tj. od 75 do 273 h). Viskoznost smo na oscilacijskem rotacijskem viskozimetru merili tako, da smo na ploščico vedno dali 5 mL polimerne raztopine. Na opisan način smo viskoznost spremljali v vzorcih, ki so bili narejeni iz naslednjih raztopin polimernih zmesi:
 - ~ LMW Hit/PEO, raztopljena v 3 % (m/v) očetni kislini,
 - ~ LMW Hit/PEO, raztopljena v 30 % (m/v) očetni kislini,
 - ~ MMW Hit/PEO, raztopljena v 3 % (m/v) očetni kislini.
 Meritve so potekale v območju strižne hitrosti 0-100 s⁻¹ pri temperaturi 25 °C.
- ~ prevodnost: Izmerili smo prevodnost raztopin polimernih zmesi z različnimi (v/v) razmerji Hit/PEO z in brez DMSO in Triton X-100TM. Meritve smo opravili tako, da smo elektrodo potopili v 50 mL vzorca, pri čemer so meritve potekale pri sobni temperaturi .
- ~ površinska napetost: Izmerili smo površinsko napetost raztopin polimernih zmesi z različnimi (v/v) razmerji Hit/PEO z in brez DMSO in Triton X-100TM. Uporabili smo Wilhelmijevo metodo s ploščico, ki jo tekočina popolnoma omoči. Meritve so potekale pri sobni temperaturi v vzorcih z volumnom 50 mL.

3.1.3.3. Izdelava in spiranje nanovlaken

Brizgo smo napolnili s 5-6 mL polimerne raztopine in skozi iglo iztisnili vse zračne mehurčke. Nato smo brizgo postavili v črpalko, ki je zagotavljala konstanten pretok polimerne raztopine (0,6 – 1,2 mL/h). Razdaljo med konico igle in zbiralom smo nastavili na 18 cm in temu primerno spreminjali napetost (od 20 do 24 kV). Izdelava NV je potekala v ali izven odsesovalne komore (digestorija) pri sobni temperaturi. Tudi sušenje je potekalo pri sobni temperaturi. Da bi se znebili morebitnega ostanka topil smo vlakna

sprali 3-krat s 75 % etanolom, 2-krat s prečiščeno vodo in 3-krat s PBS. Nato smo ponovno vzorec posušili pri sobni temperaturi.

3.1.3.4. Vrednotenje izdelanih nanovlaken

Izrezali smo košček zbirala z dimenzijami 5x5 mm s posušenim vzorcem NV in ga z obojestranskim lepilnim prevodnim trakom pritrdili na kovinske nosilce in jih nato preučili s pomočjo SEM mikroskopa pri pospeševalni napetosti 1 kV in z uporabo sekundarnega detektorja. Pri analiziranju premera NV smo si pomagali še z računalniškim programom ImageJ. Na vsaki SEM sliki smo izmerili premer 50-im naključno izbranim NV in rezultat podali kot povprečje in standardno deviacijo vseh meritev. Tako smo s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije in računalniškega programa ugotavljali premer in morfologijo izdelanih NV ter NV po spiranju.

3.2. IN VITRO BIOLOŠKO VREDNOTENJE

3.2.1. MATERIALI

- ~ celična linija keratinocitov (NCTC2544), ICLC, (Univerza v Genovi, Italija);
- ~ priprava rastnega medija za keratinocite: MEM (»Minimum essential medium«), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija) z dodatki:
 - 10 % (v/v) fetalni goveji serum (Gibco® Invitrogen, ZDA),
 - 1 % (v/v) neesencialne aminokisline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
 - 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
 - 100 U/mL antibiotik/antimikotik: 10 000 IU penicilin, 10 mg streptomycin, 2,5 µg amfotericin B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija);
- ~ sterilna voda: bidestilirana voda, sterilizirana z avtoklaviranjem po postopku za sterilizacijo tekočin (121 °C, 20 min);
- ~ 4 % formalin ali paraformaldehid (Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Nemčija);
- ~ Triton® X-100 (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- ~ MTS reagent (CellTiter 96^R Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, Madison, WI, ZDA);
- ~ barvilo za jedra: Hoechst 33342, 2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihidroklorid, (Honeywell Riedel-de Haen®, Nemčija);

- ~ barvilo za aktin:
 - Faloidin tetrametilrodamin B izotiocianat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija), rdeče obarvanje;
 - Faloidin fluorescein izotiocianat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija), zeleno obarvanje;
- ~ ProLong® Antifade Kit, Invitrogen, (Molecular Probes™, ZDA).

3.2.2. NAPRAVE

Pri gojenju celične linije keratinocitov, pri pripravi polimernih filmov in NV v gojitvenih polistirenskih ploščah in pri vrednotenju njihovega vpliva na rast keratinocitov *in vitro* smo si pomagali z naslednjimi napravami:

- ~ aseptična komora z laminarnim pretokom zraka, Iskra Pio, Slovenija;
- ~ inkubator za celične kulture, Sanyo, Japonska;
- ~ Neubauerjeva komora za štetje celic;
- ~ fotoaparat, Olympus C-7070, Japonska;
- ~ invertni svetlobni mikroskop CKX41, Olympus, Japonska;
- ~ fluorescenčni mikroskop, Olympus IX 81, Japonska;
- ~ čitalec mikrotitrne plošče, Safire 2, Tecan, Švica.

3.2.3. METODE

3.2.3.1. Gojenje celične linije keratinocitov

Keratinocyte smo gojili v gojitvenih platenkah s površino 75 cm² ali 25 cm². Rast celic smo spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom in, ko so le-te dosegle ~70 % konfluentnost, smo jih presadili v nove posode s svežim medijem. To smo naredili tako, da smo iz platenke najprej odlili medij (pri tem so celice ostale pritrjene na dno posode). Celice smo nato sprali s 5 mL steriliziranega PBS, da smo odstranili proteine govejega seruma. Dodali smo 1,5 mL (velika gojitvena platenka, S = 75 cm²) oz. 0,5 mL (mala gojitvena platenka, S = 25 cm²) raztopine encima tripsina, ki je ločil celice med seboj in od podlage. Zaprto gojitveno platenko smo za nekaj minut postavili v inkubator in s tem pospešili proces tripsinizacije. Pod invertnim svetlobnim mikroskopom smo lahko videli spremembo morfologije celic iz vretenaste v kroglasto obliko. Ko so se celice ločile od podlage, smo dodali 4,5 mL (velika gojitvena platenka) oz. 3 mL (mala gojitvena

plastenka) medija za keratinocyte s proteini govejega seruma. To je deaktiviralo tripsin, saj bi sicer predolgo delovanje tripsina lahko povzročilo poškodbe na celicah. »Odlepljene« celice smo odpipetirali v 15 mL centrifugirko in jih centrifugirali 5 min pri 1300 obratih/minuto. Supernatant smo zavrgli, celice pa redispergirali v 1,5 mL svežega medija. Del celic smo nato prenesli v novo gojitveno plastenko, v katero smo že pred tem dali 13 mL (velika gojitvena plastenka) oz. 7 mL (mala gojitvena plastenka) svežega medija. Celice smo inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂ toliko časa, da so dosegle ~70 % konfluentnost, nato pa smo jih ponovno presadili. Pri presajanju smo vedno poskrbeli, da je bila gostota celic v novi gojitveni plastenki 2×10^4 celic/cm². Številsko koncentracijo celic smo določili s pomočjo hemocitometra v Neubauerjevi komori na naslednji način: ko smo celice tripsinizirali in pripravili homogeno disperzijo celic, smo 50 µL le-te odpipetirali v 1,5 mL epico in jo razredčili s 450 µL medija. 50 µL razredčenih celic smo nato prenesli v Neubauerjevo komoro. V vseh štirih poljih hemocitometra smo prešteli celice in s pomočjo enačbe 1 določili številčno koncentracijo celic v disperziji.

$$\frac{\text{število celic}}{\text{mL}} = \frac{\text{število prešteti celic}}{\text{število prešteti polj}} \times \text{faktor redčenja} \times 10^4$$

Enačba 1: Izračun številčne koncentracije celic.

3.2.3.2. Priprava polimernih filmov in nanovlaken za *in vitro* biološko vrednotenje

V 96-vdolbinskih mikrotitrskih ploščah smo pripravili polimerne filme, da bi ugotovili, kakšen je vpliv materiala (polimerov oz. njihovih zmesi) na rast keratinocitov *in vitro*. V ta namen smo v posamezne vdolbinice odpipetirali 100 µL pripravljene raztopine polimerih zmesi Hit/PEO brez DMSO in Triton X-100TM ter pustili vzorce sušiti pri sobni temperaturi od 1 do 2 tedna, da je topilo izhlapelo. Posušene filme smo nato 4-krat sprali s 100 µL predhodno steriliziranega PBS, jim dodali 100 µL rastnega medija in 100 µL suspenzije celic, tako da je bila gostota celic v vsaki vdolbinici 2×10^4 celic/cm². Kot kontrola so nam služile vdolbinice brez polimernih filmov, v katere smo odpipetirali zgolj 100 µL medija in 100 µL suspenzije celic (tudi pri kontroli je bila gostota celic v vdolbinici 2×10^4 celic/cm²). Celice smo nato inkubirali 72 h pri 37 °C in 5 % CO₂ in jih vsak dan pregledali pod invertnim svetlobnim mikroskopom.

V 6-vdolbinskih ploščah smo ugotavljali vpliv NV na rast kartinocitov *in vitro*. V vsako vdolbino plošče smo položili krovno stekelce (22x22 mm), na katerem so bila

posušena Hit/PEO NV. NV smo nato sprali 3-krat z etanolom in nato še 3-krat s PBS ali pa le 3-krat s PBS. Po spiranju smo v vsako vdolbinico odpipetirali 1,5-2 mL medija in toliko suspenzije celic, da je bila gostota v vsaki vdolbini 2×10^4 celic/cm². Kot kontrola so nam služile celice, ki smo jih nasadili na krovno stekelce brez NV. Celice smo nato inkubirali 72 h pri 37 °C in 5 % CO₂ ter jih vsak dan spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom.

3.2.3.3. Vrednotenje vpliva polimernih filmov in nanovlaken na keratinocite

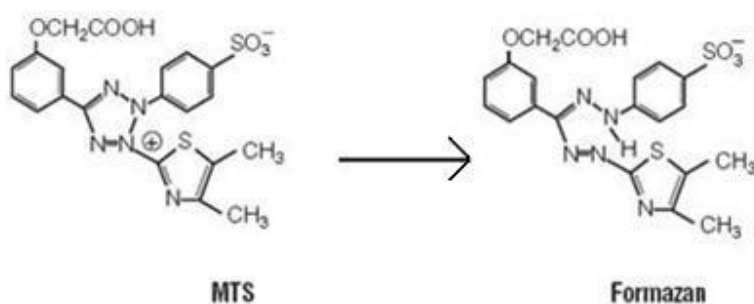
Pod invertnim mikroskopom smo po 24 h, 48 h, 72 h in 96 h inkubacije neposredno opazovali in slikali celice, ki so rastle na polimernih filmih v 96-vdolbinskih ploščah in tudi celice, ki so rastle na krovnih steklih z NV v 6-vdolbinskih ploščah. Opazovali smo morfologijo, gostoto celic in način njihove rasti (posamezno ali v skupkih).

Za opazovanje pod fluorescenčnim mikroskopom je bila potrebna predhodna priprava fiksnih preparatov celic po naslednjem postopku. Po 72 h gojenju celic na krovnih steklih z NV smo iz vdolbinic odpipetirali medij in celice sprali z 1 mL PBS. Nato smo k celicam dodali 500 µL 4 % formalina, s pomočjo katerega poteče fiksacija celic s premreževanjem. Formalin preko tvorbe inter- in intramolekularnih kovalentnih vezi z amsko skupino povzroči premreženje proteinov in nukleinskih kislin. S tem pa prepreči avtolizo oz. razkroj celic zaradi delovanja encimov proteaz. Po 10 min inkubacije pri sobni temperaturi smo formalin odpipetirali in ponovno celice sprali z 1 mL PBS, nato pa dodali 400 µL 0,25 % raztopine Triton X-100TM. Le-ta je služil za permeabilizacijo celične membrane, s čimer omogočimo vstop fluorescenčnih barvil. Po 10 min inkubacije pri sobni temperaturi smo Triton X-100TM odstranili in ponovno sprali z 1 mL PBS, nato pa dodali 500 µL raztopine barvila za jedro s koncentracijo 5 µg/mL. Le-to je občutljivo na svetlobo, zato smo preparate zaščitili pred svetlobo in s tem preprečili inaktivacijo barvila. Po 30 min inkubacije pri sobni temperaturi smo barvilo odstranili, ponovno sprali z 1 mL PBS in dodali 500 µL barvila za aktin s koncentracijo 1,1 µg/mL. Zopet je sledila 30 min inkubacija v temi, kateri je sledilo končno 2-kratno spiranje preparata z 1 mL PBS. Na objektno stekelce, ki smo ga predhodno označili, smo dali kapljico reagenta, ki preprečuje bledenje fluorescence in poveča stabilnost fluorescenčnih barvil, in nanjo položili rahlo osušeno krovno stekelce. Preparat smo nato sušili v temnem prostoru pri sobni temperaturi še dodatnih 48 h. Robove preparata smo nato premazali s transparentnim lakom za nohte. Temu je sledilo opazovanje in slikanje pripravljenih preparatov pod fluorescenčnim

mikroskopom. Podobno kot prej smo bili pozorni na morfologijo, gostoto celic in način njihove rasti (posamezno ali v skupkih).

3.2.2.6. Vrednotenje metabolne aktivnosti celic na nanovlaknih z MTS testom

MTS test je kolorimetrična metoda za merjenje aktivnosti metabolnih encimov, ki reducirajo MTS reagent v rdeče-vijolično obarvan formazan, ki je topen v celičnem mediju. MTS reagent je zmes tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol v obliki soli) in fenazin etosulfata, ki je reagent za prenos elektronov (34). Tetrazolijeva sol prehaja v celice, kjer se pod vplivom encimov v mitohondrijih reducira do formazana (slika 12). Pretvorbo omogočajo NADPH- ali NADH- dehidrogenazni encimi v metabolno aktivnih celicah. Količina nastalega formazana je tako sorazmerna številu živih celic in jo lahko na mikrotitrskem čitalcu merimo spektrofotometrično pri 490 nm (34).



Slika 12: Kemijski strukturi MTS reagenta in formazana.

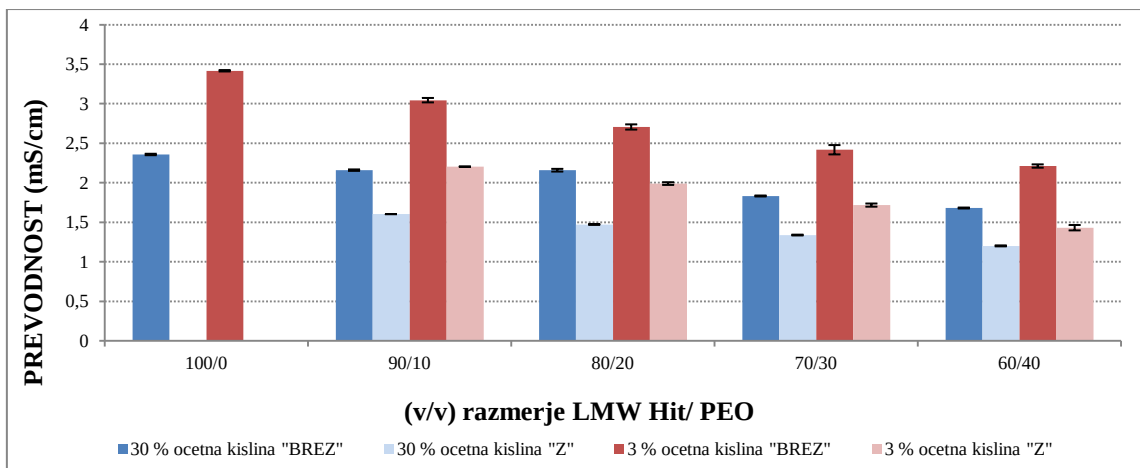
Za izvedbo MTS testa smo uporabili velika krovnna stekelca (22x22 mm), vendar le tista, na katerem so bila izdelana NV iz raztopine polimerne zmesi LMW Hit/PEO z (v/v) razmerjem 70/30. Na krovno stekelce z NV smo nasadili keratinocite z gostoto 2×10^4 celic/cm² in jih 72 h inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂. Nato smo celice tripsinizirali, da so se ločile med seboj in od podlage. 100 µL suspenzije celic smo nato prenesli v mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami in nato dodali še 10 µL MTS reagenta. Po treh urah inkubacije pri 37 °C smo vzorcu izmerili absorbanco nastalega formazana pri 490 nm.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. VREDNOTENJE SPREMENLJIVK POLIMERNE RAZTOPINE

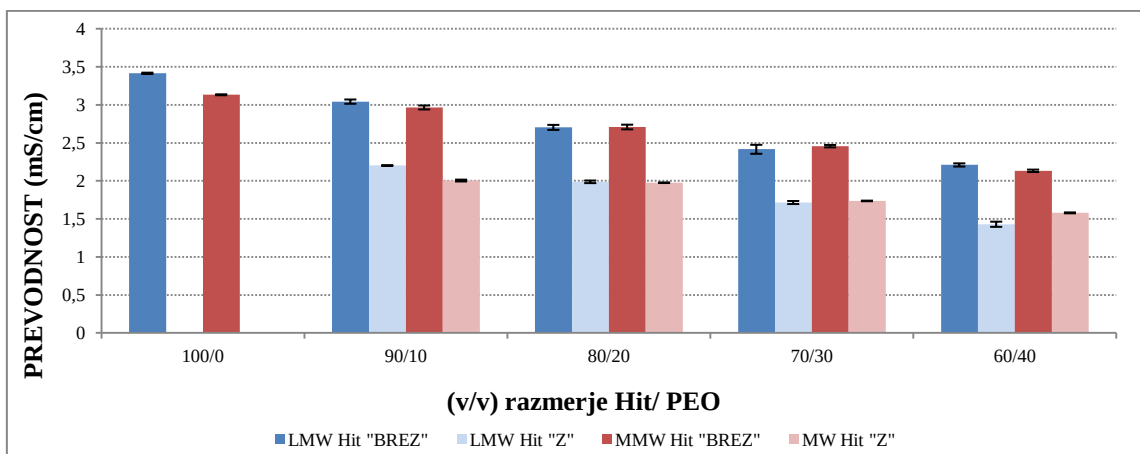
4.1.1. Prevodnost

Električna prevodnost je lastnost snovi, ki podaja razmerje med gostoto električnega toka in jakostjo električnega polja (35). Polimerne raztopine, ki jih želimo elektrostatsko sukati ne smejo biti niti preveč niti premalo prevodne.



Slika 13: Primerjava prevodnosti raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 30 % oz. 3 % očetni kislini.

»BREZ«: brez DMSO in Triton X-100TM; »Z«: z DMSO in Triton X-100TM.



Slika 14: Primerjava prevodnosti raztopin polimernih zmesi LMW Hit oz. MMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.

»BREZ«: brez DMSO in Triton X-100TM; »Z«: z DMSO in Triton X-100TM.

V naših poskusih smo preverjali kako **pH topila oz. koncentracija očetne kisline** (30 % ali 3 % vodna raztopina očetne kisline) in **molekulska masa hitosana** (LMW Hit in MMW Hit) vplivata na prevodnost polimernih raztopin. Slika 13 prikazuje, da je prevodnost raztopin polimernih zmesi Hit/PEO, ki so bile pripravljene v 3 % vodni

raztopini očetne kisline, v povprečju za eno enoto višja kot pa prevodnost raztopin zmesi, ki so bile pripravljene v 30 % očetni kislini. Dobljeni rezultati so v nasprotju s pričakovanji, saj smo mislili, da bo v 30 % očetni kislini z nižjim pH (preglednica I), kjer je več $-NH_2$ skupin hitosana v protonirani obliki in je ionska gostota večja, tudi prevodnost polimerne raztopine višja, kot pa v 3 % očetni kislini z višjim pH. A očitno so v ozadju še drugi dejavniki, ki vplivajo na omenjeno spremenljivko.

Preglednica I: Primerjava pH 3 % in 30 % vodne raztopine očetne kisline.

	pH
3 % vodna raztopina očetne kisline	2,54
30 % vodna raztopina očetne kisline	2,20

Po drugi strani slika 14 prikazuje, da so razlike v prevodnosti raztopin hitosana z nizko in srednjo molekulsko maso zanemarljivo majhne. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da ima pH oz. koncentracija očetne kisline znatno večji vpliv na prevodnost raztopin polimernih zmesi kot pa molekulska masa hitosana. S tem pa tudi ugotovimo, da je pri izbiri hitosana z vidika prevodnosti raztopin vseeno ali uporabimo hitosan višje ali nižje molekulske mase, bolj pomembno je, da ga raztopimo v ustrezno koncentrirani očetni kislini. V našem primeru sta se tako 3 % kot 30 % očetna kislina izkazali kot ustrezni topili, saj smo pri obeh koncentracijah na konici igle uspeli vzpostaviti stabilen kontinuiran curek.

V nadaljevanju smo skušali ugotoviti povezavo med prevodnostjo raztopin in **(v/v) razmerjem Hit/PEO**. Podobno kot v študiji Chena in njegovih sodelavcev (25) smo tudi mi ugotovili, da prevodnost z večanjem deleža PEO v zmesi pada in je tako najmanjša pri proučevani zmesi Hit/PEO 60/40 (v/v), kar je lepo vidno tako na sliki 13 kot tudi na sliki 14. Rezultat je pričakovan, saj je prevodnost 3 % osnovne raztopine PEO, ki spada med neionogene polimere, nižja kot prevodnost 2 % raztopine hitosana, ki ga uvrščamo med polimere kationskega tipa. Tak rezultat dobimo neglede na to, ali kot topilo uporabimo 3 % ali 30 % očetno kislino (preglednica II).

Preglednica II: Primerjava prevodnosti raztopin PEO in LMW Hit v 3 % oz. 30 % očetni kislini.

	Prevodnost (mS/cm)
3 % (m/v) raztopina PEO v 3 % očetni kislini	0,849 ± 0,007
2 % (m/v) raztopina LMW Hit v 3 % očetni kislini	3,416 ± 0,009
3 % (m/v) raztopina PEO v 30 % očetni kislini	1,286 ± 0,011
2 % (m/v) raztopina LMW Hit v 30 % očetni kislini	2,357 ± 0,009

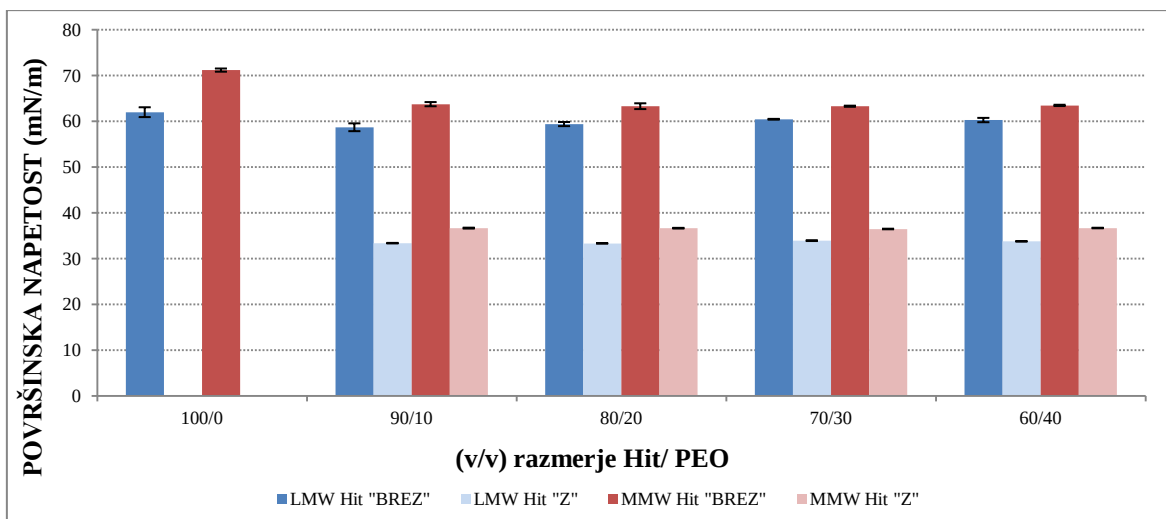
Na prevodnost polimernih raztopin lahko vplivamo z dodatkom sotopila in površinsko aktivne snovi (PAS). Tako smo ugotavljali **vpliv dodatka DMSO in Triton X-100TM**. Triton X-100TM je neionogena PAS, ki naj bi po poročanju skupine raziskovalca Bhattaraija izboljšala lastnosti raztopin polimerne zmesi Hit/PEO (prevodnost, površinsko napetost in viskoznost) in tako omogočila izvedljivost elektrostatskega sukanja tudi tistih raztopin polimerne zmesi, ki vsebujejo visok delež hitosana (9). Po drugi strani je DMSO sotopilo organskega izvora, ki naj bi podobno kot Triton X-100TM tudi vplivalo na lastnosti raztopine polimerne zmesi in tako izboljšalo enotnost izdelanih NV v smislu zmanjšanja števila vozlov (9). Sliki 13 in 14 prikazujeta, da dodatek PAS in sotopila v raztopino zmesi polimerov zmanjša njeno prevodnost. Da bi ugotovili, kateri izmed dodatkov bolj zniža prevodnost, smo pripravili raztopini polimernih zmesi LMW Hit/PEO 60/40 (v/v) le z dodatkom DMSO in le z dodatkom Triton X-100TM. Kot kažejo rezultati v preglednici III, dodatek sotopila zniža prevodnost raztopine bolj kot pa dodatek PAS. Vidimo tudi, da se prevodnost polimerne raztopine z obema dodatkom skoraj ujema s prevodnostjo polimerne raztopine le z dodatkom DMSO oz. prevodnost polimerne raztopine brez dodatkov se ujema s prevodnostjo polimerne raztopine le z dodatkom Triton X-100TM. Iz tega sklepamo, da je znižanje prevodnosti raztopine polimerne zmesi predvsem posledica dodatka sotopila DMSO.

Preglednica III: Primerjava prevodnosti raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO z razmerjem 60/40 (v/v) v 30 % očetni kislini.

	Prevodnost (mS/cm)
Hit/PEO 60/40 le z dodatkom DMSO	1,213 ± 0,006
Hit/PEO 60/40 le z dodatkom Triton X-100	1,636 ± 0,007
Hit/PEO 60/40 z obema dodatkom	1,201 ± 0,006
Hit/PEO 60/40 brez dodatkov	1,680 ± 0,006

4.1.2. Površinska napetost

Površinska napetost je lastnost kapljavine, ki podaja energijo na enoto površine (35) in je pri elektrostatskem sukanju ena izmed zelo pomembnih spremenljivk. Curek se znotraj generiranega električnega polja oblikuje na tisti točki, kjer elektrostatske sile presežejo površinsko napetost polimerne raztopine (15). Nižja površinska napetost polimerne raztopine torej omogoča izvajanje elektrostatskega sukanja pri nižji napetosti električnega polja, zato je bolje uporabljati raztopine polimerov z nižjo površinsko napetostjo (14).



Slika 15: Primerjava površinske napetosti raztopin polimernih zmesi **LMW Hit** oz. **MMW Hit** in PEO v 3 % očetni kislini. »**BREZ**«: brez DMSO in Triton X-100™; »**Z**«: z DMSO in Triton X-100™.

Površinsko napetost smo merili raztopinam zmesi Hit/PEO v 3 % vodni raztopini očetne kisline in pri tem proučevali **vpliv molekulske mase hitosana** na izbrano spremenljivko. Rezultati na sliki 15 kažejo, da je površinska napetost pri raztopinah hitosana srednje molekulske mase za 3-5 mN/m višja v primerjavi z nizko molekularnim hitosanom. Na podlagi tega rezultata se je pri izbiranju hitosana bolje odločiti za hitosan nižje molekulske mase, saj imajo raztopine polimerne zmesi Hit/PEO nižjo površinsko napetost.

Razlik v površinski napetosti zmesi z različnim **(v/v) razmerjem Hit/PEO** ni. Opazimo pa, da se površinska napetost po dodatku PEO v raztopino hitosana zmanjša ne glede na molekulsko maso hitosana, kar se sklada z rezultati študije raziskovalne skupine Zianiya in sodelavcev (15). V njej so natančno proučevali vpliv dodanega PEO na površinsko napetost hitosanske raztopine in ugotovili, da je njegov učinek odvisen od koncentracije očetne kisline. Dodatek PEO, ki je neionogen polimer, v raztopino hitosana v 10 % očetni kislini, je vodilo v znižanje površinske napetosti raztopine. Po drugi strani pa je pri raztapljanju hitosana v 50 % ali 90 % očetni kislini, dodan PEO zvišal površinsko napetost (15).

Podobno kot pri prevodnosti smo opazili velik **vpliv dodatkov DMSO in Triton X-100™** na površinsko napetost. Slika 15 jasno prikazuje, da se površinska napetost polimerne raztopine po dodatku sotpila in PAS vedno zniža za skoraj 50 % glede na polimerno raztopino brez dodatkov. Predvidevamo, da je za to v največji meri odgovoren Triton X-100™, saj se njegove amfifilne molekule takoj po dodatku v raztopino polimerne

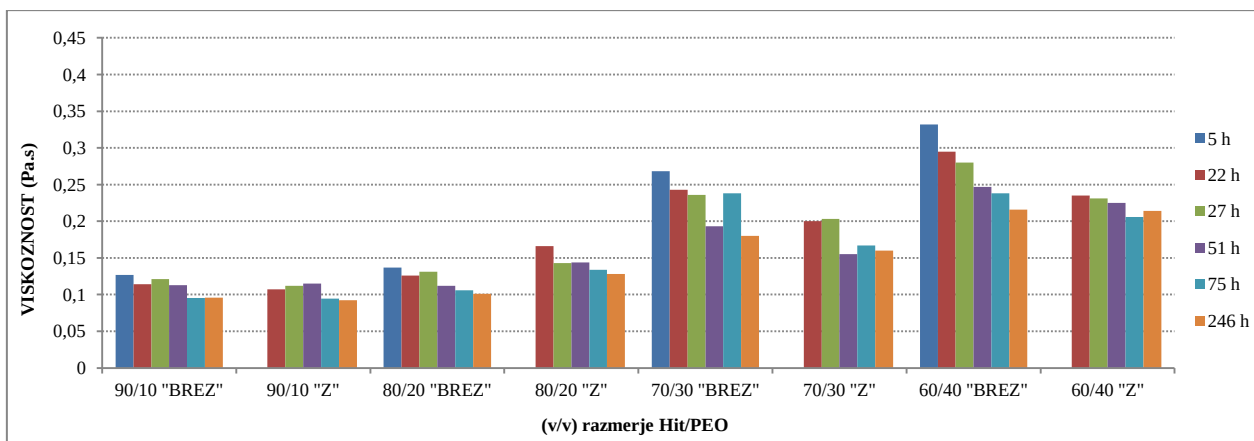
zmesi razporedijo na mejo površine in znižajo medfazno napetost med tekočino in zrakom. Podobno so vpliv dodatka neionogene PAS proučevali v študiji Zianija s sodelavci (15), pri čemer so v polimerne raztopine namesto Triton X-100TM dodajali Tween 20. Tudi v tej raziskavi so ugotovili, da že dodatek majhne količine neionogene PAS precej zniža površinsko napetost polimerne raztopine. To je zaželeno, saj v tem primeru površinsko napetost raztopine presežemo z ustrezno nižjo napetostjo električnega polja in tako vzpostavimo kontinuiran nitrast curek polimerne raztopine pri milejših pogojih (14).

4.1.3. Viskoznost

Viskoznost oz. notranje trenje je lastnost tekočine, ki zavira njen tok tako, da njene počasnejše plasti zavirajo hitrejšje plasti (35). Pri izdelavi NV s postopkom elektrostatskega sukanja pa je viskoznost kritični dejavnik, ki vpliva na izvedljivost elektrostatskega sukanja polimerne raztopine (9, 15). Če je raztopina, iz katere nameravamo izdelati NV, premalo viskozna, na konici igle ne bomo dobili stabilnega curka. In obratno, če je preveč viskozna, je črpalka ne bo mogla potisniti skozi iglo (2). Zasledili smo podatek, da se maksimalna viskoznost poljubne polimerne raztopine, ki jo je še mogoče potisniti skozi iglo, v odvisnosti od uporabljenega polimera nahaja znotraj območja od 0,1 do 21,5 Pa.s (14). Tako smo tudi mi ugotovili, da je 2 % raztopina hitosana, ki ima viskoznost v odvisnosti od molekulske mase polimera in koncentracije očetne kisline v območju od 0,061 do 2,770 Pa.s, previskozna in je zato ne moremo neposredno uporabiti za izdelavo NV (preglednica IV). Da bi rešili problem, smo na podlagi študije Battaraija in njegovih sodelavcev raztopini hitosana dodali PEO. Raziskovalci v svojem raziskovalnem delu razlagajo, da se molekule PEO s svojimi -OH skupinami vežejo na hrbtišče hitosanskih molekul in na ta način zmotijo samozdruževanje hitosanskih verig (9). Sprememba, ki jo povzroči dodatek PEO, naj bi se fizikalno odražala z zmanjšanjem viskoznosti (9, 25).

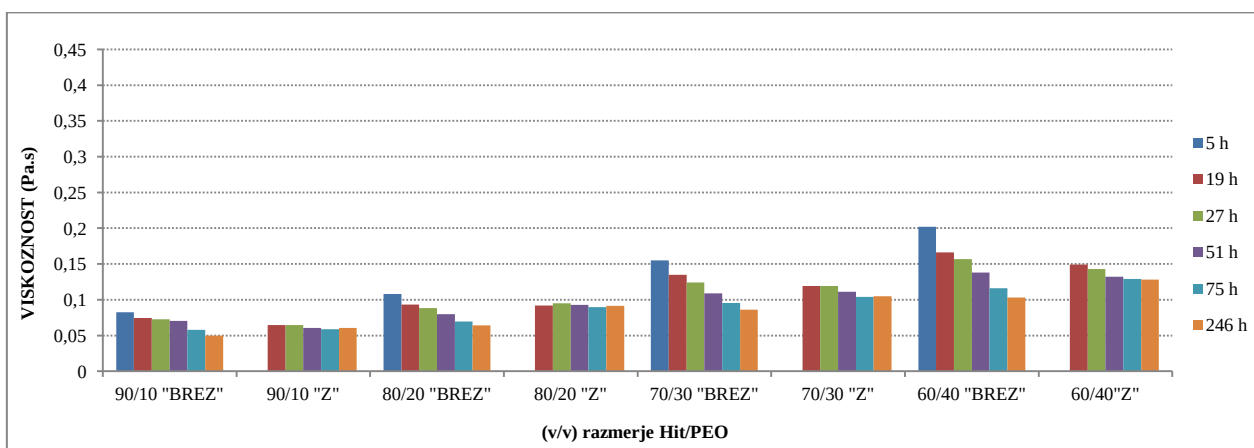
Preglednica IV: Primerjava viskoznosti raztopin LMW Hit in MMW Hit v 3 % in 30 % očetni kislini.

	viskoznost (Pa.s)
2 % (m/v) raztopina LMW Hit v 30% očetni kislini	0,071
2 % (m/v) raztopina LMW Hit v 3 % očetni kislini	0,061
2 % (m/v) raztopina MMW Hit v 3% očetni kislini	2,770



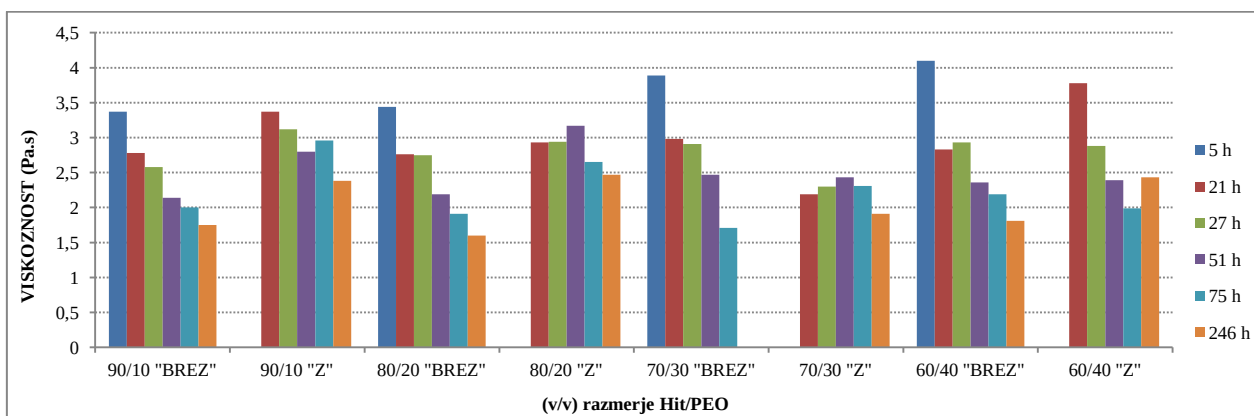
Slika 16: Viskoznost raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 30 % očetni kislini.

»BREZ«: brez DMSO in Triton X-100™; »Z«: z DMSO in Triton X-100™.



Slika 17: Viskoznost raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.

»BREZ«: brez DMSO in Triton X-100™; »Z«: z DMSO in Triton X-100™.



Slika 18: Viskoznost raztopin polimernih zmesi MMW Hit in PEO v 30 % očetni kislini.

»BREZ«: brez DMSO in Triton X-100™; »Z«: z DMSO in Triton X-100™.

Ker je viskoznost raztopine pomembna spremenljivka, ki vpliva na proces in produkt elektrostatskega sukanja, smo želeli preveriti, ali se viskoznost polimerne

raztopine s časoma spreminja ali je konstantna. Predvidevamo namreč, da je konstantna viskoznost potrebna za ponovljivost procesa elektrostatskega sukanja. Tako smo pripravili zmesi raztopin nizko oz. srednje molekularnega hitosana in PEO v 3 % oz. 30 % očetni kislini ter spremljali njihovo viskoznost v času 1 tedna po izdelavi.

Sliki 17 in 18, ki prikazujeta viskoznosti polimernih zmesi nizko molekularnega hitosana s PEO in srednje molekularnega hitosana s PEO v 3 % očetni kislini, kažeta velik **vpliv molekulske mase hitosana na viskoznost** polimerne raztopine. Pri vzorcih raztopin hitosana srednje molekulske mase je namreč viskoznost za kar 1-3 Pa.s višja kot pri vzorcih nizko molekularnega hitosana. V študiji Zianija in njegovih sodelavcev razlagajo, da je vpliv molekulske mase na viskoznost posledica konformacije hitosanskih verig (15). Verige hitosana z molekulsko maso večjo od 223 kDa (v našem primeru je tak hitosan srednje molekulske mase z molekulsko maso v območju 190-390 kDa) se v raztopini nahajajo v zvitih obliki (konformacija tuljave). Po drugi strani pa so verige hitosana z molekulsko maso manjšo od 148 kDa (sem sodi hitosan nizke molekulske mase z molekulsko maso v območju 50-190 kDa) nahajajo v raztopini v iztegnjeni obliki (konformacija palice) (15). Posledica različnih konformacij je razlika v porazdelitvi nabojev na verigah in v številu vodikovih vezi med polimernimi verigami (15). Tako lahko sklepamo, da pri hitosanu s srednjo molekulsko maso, ki se v večjem deležu nahaja v konformaciji tuljave, lahko nastane več inter- in intramolekulskih povezav, ki posledično povečajo viskoznost raztopine.

Rezultati na slikah 16, 17 in 18 kažejo tudi to, da **viskoznost raztopin s časom pada**, kar je bolj izraženo pri vzorcih brez dodanega sotpila tj. DMSO in PAS tj. Triton X-100TM. Trend je najbolj opazen pri zmesih hitosana nizke molekulske mase v 3 % očetni kislini (slika 17). V tem primeru se viskoznost raztopin z dodatkom sotpila in PAS po 1 tednu ustali, saj razlik v izmerjeni viskoznosti v zadnjih dveh časovnih točkah praktično ni. Torej lahko zaključimo, da potrebujejo vzorci raztopin polimernih zmesi hitosana nizke molekulske mase in PEO 1 teden, da se njihova viskoznost ustali, zato bi bila z vidika ponovljivosti elektrostatskega sukanja smiselno uporabiti teden dni stare raztopine. Le-te imajo stabilno viskoznost, kar pomeni, da je v raztopini doseženo neko ravnovesno stanje interakcij med polimernimi verigami, to pa zelo verjetno vpliva na proces elektrostatskega sukanja. Podoben trend opazimo pri raztopinah polimernih zmesi hitosana nizke molekulske mase v 30 % očetni kislini (slika 16). Pri vzorcih hitosana srednje molekulske mase v 3 % očetni kislini (slika 18) trend ni tako očitno opazen,

viskoznost pa se tudi po 1 tednu ne ustali. Na podlagi vseh teh rezultatov lahko zaključimo, da je za elektrostatsko sukanje najprimernejši hitosan nizke molekulske mase predvsem iz dveh razlogov: 1.) viskoznost raztopin ni niti previsoka niti prenizka za izdelavo NV z metodo elektrostatskega sukanja in 2.) po enem tednu se viskoznost raztopin polimernih zmesi ustali, torej dobimo spremenljivko, ki je konstantna.

Po drugi strani iz rezultatov na slikah 16 in 17, ki prikazujeta viskoznost raztopin polimernih zmesmi hitosana nizke molekulske mase s PEO v 3 % in 30 % očetni kislini, vidimo, da je **vpliv pH topila oz. koncentracije očetne kisline** na viskoznost polimerne zmesi minimalen. Pri raztopinah zmesi, kjer smo polimere raztopili v 30 % očetni kislini, so bile viskoznosti za približno 0,05-0,1 Pa.s višje kot pa pri vzorcih, kjer smo polimere raztopili v 3 % očetni kislini. To se sklada s predhodno objavljenimi rezultati, kjer prav tako poročajo, da se pri uporabi očetne kisline z nižjim pH viskoznost raztopine polimerne zmesi poveča (15). Razlagajo, da je v bolj kisli raztopini večje število prostih amino skupin hitosana v protonirani obliki, zaradi česar se konformacija verig spremeni iz iztegnjene v zvito in se posledično viskoznost poveča (15). Rezultati v preglednici V kažejo, da je učinek pH oz. koncentracije očetne kisline na viskoznost bolj opazen pri 3 % raztopini PEO (razlika je 0,35 Pa.s) kot pa pri 2 % raztopini hitosana nizke molekulske mase (razlika je 0,01 Pa.s) in pri zmesih LMW Hit/PEO (razlika je ~ 0,05 Pa.s).

Preglednica V: Primerjava viskoznosti raztopin PEO, LMW Hit in njunih zmesi brez DMSO in Triton X-100.

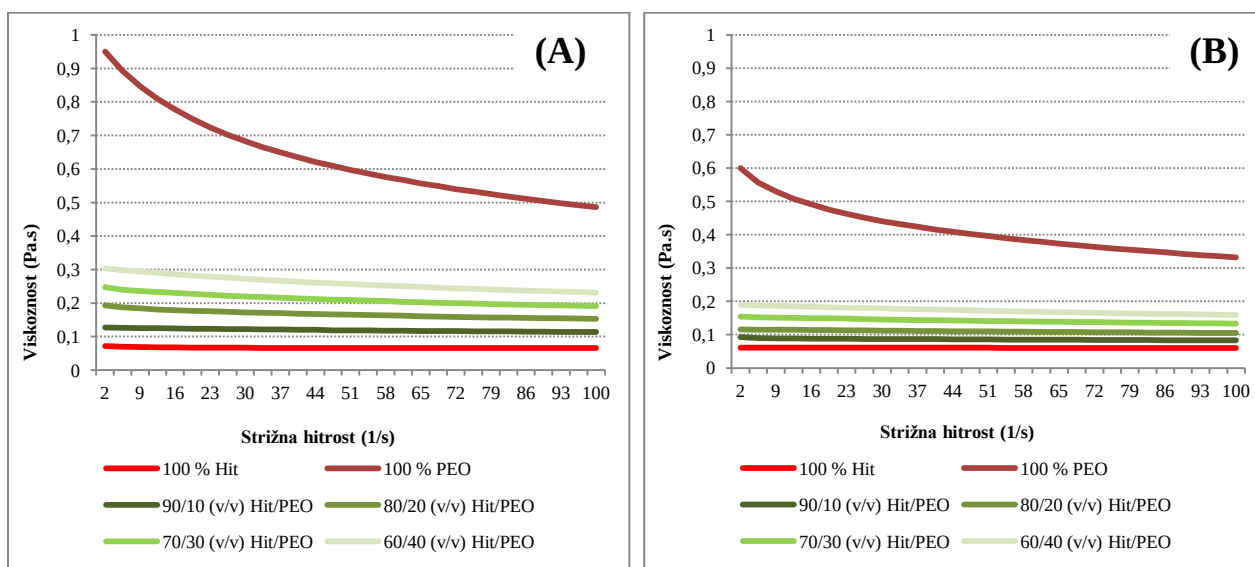
	viskoznost (Pa.s)
3 % (m/v) PEO v 30 % očetni kislini	0,950
2 % (m/v) LMW Hit v 30 % očetni kislini	0,072
90/10 (v/v) Hit/PEO	0,127
80/20 (v/v) Hit/PEO	0,193
70/30 (v/v) Hit/PEO	0,247
60/40 (v/v) Hit/PEO	0,304
3 % (m/v) PEO v 3 % očetni kislini	0,600
2 % (m/v) LMW Hit v 3 % očetni kislini	0,061
90/10 (v/v) Hit/PEO	0,092
80/20 (v/v) Hit/PEO	0,116
70/30 (v/v) Hit/PEO	0,154
60/40 (v/v) Hit/PEO	0,190

Viskoznost polimernih raztopin narašča z večanjem deleža PEO v polimerni zmesi (slika 19), kar je v nasprotju s predhodno objavljenimi rezultati študije raziskovalca Bhattaraija in njegovih sodelavcev (9). Po njihovem mnenju naj bi PEO znižal viskoznost

raztopine polimerne zmesi, kar naj bi dosegel s porušenjem vodikovih povezav med polimernimi verigami hitosana. Pri tem so dokazali tudi to, da viskoznost polimernih raztopin pada sorazmerno z večanjem deleža PEO v zmesi (9). Pri nas zasledimo ravno obraten trend, torej viskoznost je najvišja pri raztopini polimerne zmesi z največjim deležem PEO tj. pri polimerni zmesi Hit/PEO 60/40 (v/v). Dobljeni rezultat lahko po eni strani razložimo na podlagi celokupne koncentracije polimera (Hit in PEO skupaj) v posameznem vzorcu. Le-ta je največja ravno pri vzorcu Hit/PEO 60/40 (v/v) in znaša 2,4 % (preglednica VI). Po drugi strani pa iz slike 19 vidimo, da ima polimerna raztopina, ki vsebuje zgolj PEO, najvišjo viskoznost oz. raztopina, ki vsebuje zgolj hitosan, najnižjo viskoznost. Tako lahko brez upoštevanja interakcij preprosto sklepamo, da večji kot je dodatek PEO v polimerno raztopino hitosana, višja bo viskoznost raztopine dobljene polimerne zmesi.

Preglednica VI: Celokupna koncentracija polimera, tj. hitosana (Hit) in PEO, v končni zmesi.

(v/v) razmerje Hit/PEO	celokupna koncentracija polimera (m/v) %
100/0	2,0
90/10	2,1
80/20	2,2
70/30	2,3
60/40	2,4



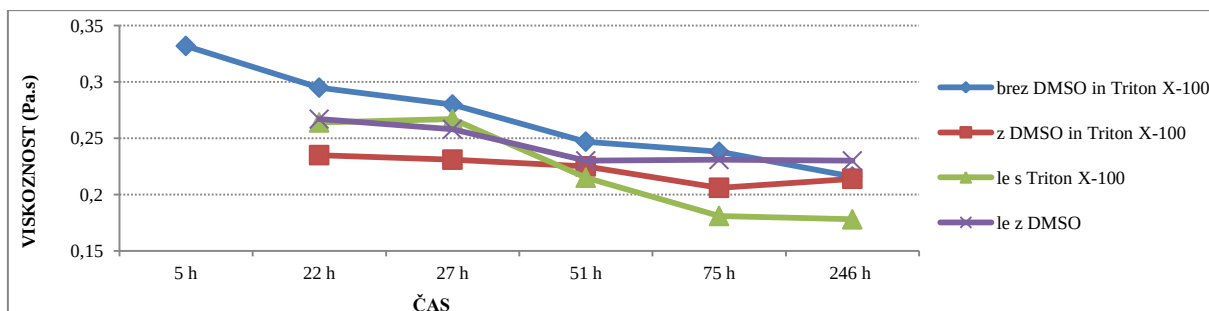
Slika 19: Viskoznost raztopin LMW Hit in PEO ter njihovih zmesi v odvisnosti od strižne napetosti.

(A) Topilo je 30 % očetna kislina. (B) Topilo je 3 % očetna kislina.

Vpliv dodanega PEO na viskoznost hitosanske raztopine so zelo natančno proučevali v predhodno objavljeni raziskavi Zianija in njegovih sodelavcev. Prišli so do

zanimivega zaključka, da je učinek PEO na viskoznost hitosanske raztopine (podobno kot v primeru prevodnosti) odvisen od koncentracije očetne kisline (15). Ugotovili so, da je pri polimernih zmesih Hit/PEO, kjer so kot topilo uporabili 10 % očetno kislino, prisotnost PEO znižala viskoznost raztopine. Po drugi strani pa je dodatek PEO v raztopino polimerov v 50 % ali 90 % očetni kislini povzročil zvišanje viskoznosti. Ta ugotovitev v našem primeru ne drži, saj je dodatek PEO v raztopino hitosana ne glede na koncentracijo očetne kisline vedno zvišal viskoznost raztopine, pri tem pa smo dodatno dokazali še, da se viskoznost raztopine povečuje sorazmerno s količino dodanega PEO in s tem ovrgli predpostavke študij Bhattaraija in Zianija.

Nazadnje smo vrednotili še **vpliv posameznega dodatka** t.j. DMSO ali Triton X-100TM **in njune kombinacije na viskoznost raztopin** na primeru polimerne raztopine LMW Hit/PEO 60/40 (v/v) v 3 % očetni kislini. V začetni točki je viskoznost raztopine zmesi Hit/PEO z obema dodatkom manjša kot pa viskoznost raztopine zmesi Hit/PEO brez dodatkov (slika 20). V končni časovni točki pa je viskoznost obeh raztopin praktično enaka in doseže vrednost 0,214 Pa.s pri vzorcu z obema dodatkom oz. 0,216 Pa.s pri vzorcu brez dodatkov. Viskoznost raztopine zgolj z dodatkom Triton X-100TM tekom 1 tedna postopoma pada in doseže najnižjo vrednost 0,178 Pa.s. Po drugi strani viskoznost raztopine zgolj z dodatkom DMSO v začetku pada, v zadnjih časovnih točkah pa se praktično ne spreminja več in doseže stabilno vrednost 0,23 Pa.s, ki pa je višja od končne viskoznosti raztopine z obema dodatkom (0,214 Pa.s). Tako lahko zopet enostavno brez upoštevanja interakcij pojasnimo, da sta pri zniževanju viskoznosti na začetku pomembna oba dodatka, po 1 tednu pa je dodatno znižanje viskoznosti polimernih zmesi zgolj posledica dodanega Triton X-100TM. Vpliv neionske PAS na viskoznost polimernih zmesi Hit/PEO je v svoji študiji proučeval tudi Ziani s sodelavci (15). Kot neionogeno PAS so namesto Triton X-100TM uporabili Tween 20 in prišli do podobnih zaključkov, saj se je tudi viskoznost njihovih raztopin polimernih zmesi po dodatku PAS znižala. Čeprav Tween 20 s polimerom ne more tvoriti elektrostatskih povezav, pa se z verigami hitosana in PEO poveže preko hidrofobnih interakcij in na ta način zmoti povezovanje samih polimernih verig med seboj, kar zniža viskoznost polimernih raztopin (15). Podobno velja tudi v primeru Triton X-100TM.



Slika 20: Viskoznost raztopin polimernih zmesi LMW Hit/PEO z razmerjem 60/40 (v/v) v 30 % očetni kislini.

4.2. VREDNOTENJE SPREMENLJIVK TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA

Za nastanek NV s postopkom elektrostatskega sukanja mora biti curek polimerne raztopine na konici igle stabilen in kontinuiran. Zato smo pri vsakem poskusu preučili in optimizirali tri spremenljivke: napetost električnega polja, pretok polimerne raztopine in razdaljo od konice igle do zbirala. Vrednosti le-teh so prikazane v preglednici VII.

Preglednica VII: Spremenljivke elektrostatskega sukanja, ki so zagotavljale stabilen curek.

	NAPETOST	PRETOK	RAZDALJA
LMW Hit/PEO v 3 % očetni kislini	20 kV	0,6 mL/h	18 cm
LMW Hit/PEO v 30 % očetni kislini	20 kV	0,6 mL/h	18 cm
MMW Hit/PEO v 3 % očetni kislini	22-24 kV	1,2 mL/h pri 60/40 (v/v) Hit/PEO 1,1 mL/h pri 70/30 (v/v) Hit/PEO 0,9 mL/h pri 80/20 (v/v) Hit/PEO 0,7 mL/h pri 90/10 (v/v) Hit/PEO	18 cm

4.2.1. Razdalja od konice igle do zbirala

Razdalja od konice igle do zbirala je ena izmed pomembnih spremenljivk elektrostatskega sukanja. Čas potovanja curka polimerne raztopine od konice igle do zbirala mora biti dovolj dolg, da se nastala NV posušijo, preden dosežejo zbiralo (14). Če je razdalja prekratka, topilo iz curka polimerne raztopine ne more v celoti izhlapeti, zaradi česar se neposušena vlakna prilepijo na zbiralo, kar lahko povzroča težave pri odstranjevanju NV iz zbirala in vpliva na njihovo morfologijo (8). Poleg tega, da razdalja vpliva na izhlapevanje topila, ima velik vpliv tudi na moč električnega polja, in sicer z daljšanjem razdalje med nabito polimerno raztopino in zbiralom se hkrati manjša moč električnega polja. Da bo tudi v tem primeru površinska napetost tekočine presežena in se bo iz Taylorjevega stožca oblikoval nitast curek, je sočasno z daljšanjem razdalje potrebno povečati še napetost generatorja in s tem moč električnega polja, ki se ustvari med konico igle in zbiralom (2). V našem primeru smo vedno uporabljali razdaljo 18 cm in glede na

uporabljen sistem, ki smo mu predhodno izmerili prevodnost, površinsko napetost in viskoznost, spreminjali napetost generatorja in pretok črpalke, da je nastal stabilen kontinuiran curek polimerne raztopine.

4.2.2. Napetost električnega polja

Pri izdelavi NV je med konico igle in zbiralom potrebno ustvariti električno polje, kar dosežemo s priključitvijo naprave elektrostatskega sukanja na generator visoke napetosti. Topilo med potovanjem v električnem polju počasi izhlapeva, polimer se zgosti in nastanejo NV, ki se naložijo na ozemljeno zbiralo (14). Če pogledamo preglednico VII, vidimo, da smo za nastanek kontinuiranega stabilnega curka v primeru raztopin hitosana srednje molekulske mase napetost morali povečati za 2-4 kV v primerjavi z napetostjo, ki je bila ustrezna za elektrostatsko sukanje raztopin hitosana nizke molekulske mase. Na podlagi tega smo ugotovili, da imata na napetost največji vpliv viskoznost in površinska napetost polimerne raztopine. Hitosan večje molekulske mase je bolj viskozen, kar pomeni, da potrebujemo za nastanek NV večje elektrostatske sile in s tem večjo napetost električnega polja (15). Poleg večje viskoznosti ima omenjeni hitosan tudi višjo površinsko napetost, ki jo lahko presežemo le s povečanjem napetosti električnega polja (14). Presenečeni smo bili, da pH topila oz. koncentracija očetne kisline ne vplivata na potrebno napetost električnega polja. Pri uporabi 3 % in 30 % očetne kisline je bila električna napetost, potrebna za nastanek stabilnega curka, enaka. Očitno je razlika v pH-ju 30 % in 3 % očetne kisline, ki znaša le 0,3 enote (preglednica I), tako majhna, da ne vpliva na napetost, ki jo potrebujemo za nastanek stabilnega curka. Tudi vpliva prevodnosti na potrebno napetost električnega polja nismo dokazali, saj je bila kljub zamenjavi 3 % očetne kisline s 30 % očetno kislino in s tem z znižanjem prevodnosti raztopine polimerne zmesi Hit/ PEO za kar 1 mS/cm (slika 13), potrebna enaka napetost. Očitno je bila tudi razlika v prevodnosti raztopin zmesi Hit/ PEO premajhna, da bi le-ta vplivala na napetost, ki jo potrebujemo za nastanek stabilnega curka.

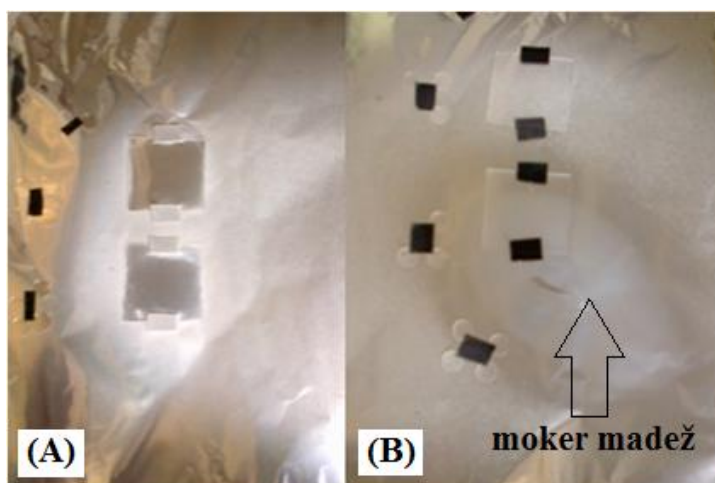
4.2.3. Pretok polimerne raztopine

Tudi na pretok raztopine polimerne zmesi skozi iglo ima največji vpliv viskoznost polimerne raztopine. Podatki v preglednici VII kažejo, da smo pri izdelavi NV iz hitosana srednje molekulske mase potrebovali večji pretok kot pa pri izdelavi NV iz hitosana nizke molekulske mase. Vpliv viskoznosti na pretok raztopine polimerne zmesi je lepo viden tudi

v primeru priprave NV iz zmesi z različnim deležem hitosana srednje molekulske mase in PEO. Pri vzorcu Hit/PEO 60/40 (v/v), ki je najbolj viskozen, smo za stabilen kontinuiran curek potrebovali največji pretok (1,2 mL/h) oz. pri vzorcu Hit/PEO 90/10 (v/v), ki je najmanj viskozen, smo potrebovali najmanjši pretok (0,7 mL/h). To je pričakovano, saj je pri manj viskoznem vzorcu potrebna manjša sila, s katero črpalka potiska raztopino skozi tanko iglo, kot pri bolj viskoznem. Podobno kot v primeru električne napetosti tudi na pretok ne vplivata niti pH topila oz. koncentracija očetne kisline niti prevodnost raztopine polimerne zmesi Hit/PEO. Čeprav smo 3 % očetno kislino zamenjali s 30 % očetno kislino in s tem znižali pH topila za 0,3 enote (preglednica I) ter hkrati znižali še prevodnost polimernih zmesi Hit/PEO za kar 1 mS/cm (slika 13), smo za nastanek kontinuiranega stabilnega curka potrebovali enak pretok.

4.2.4. Pretok zraka

Elektrostatsko sukanje smo na začetku izvajali v odsesovalni komori (digestoriju), kasneje pa smo morali napravo za elektrostatsko sukanje zaradi zasedenosti digestorija premakniti v drug prostor brez odzračevanja, torej brez pretoka zraka. Pri izdelavi vlaken izven digestorija smo že po 15 min razprševanja na zbiralu opazili moker polimerni madež (slika 21). Iz tega sklepamo, da se NV brez pretoka zraka na poti od konice igle do zbirala ne posušijo, kar dokazuje, kako pomemben parameter je pretok zraka med procesom elektrostatskega sukanja, saj le-ta pospeši sušenje vlaken.



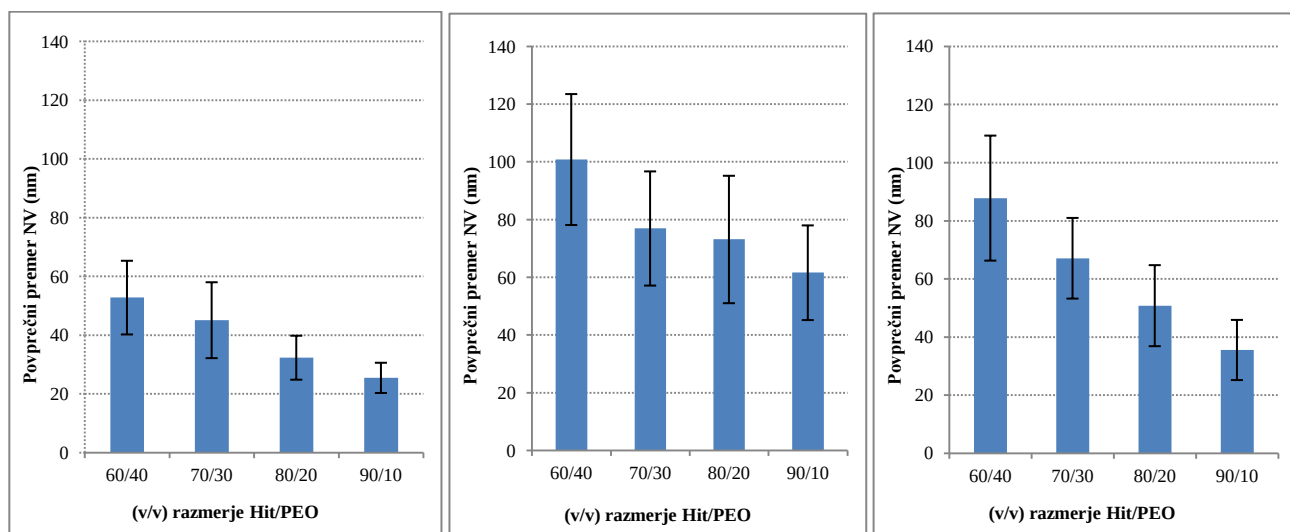
Slika 21: Produkt elektrostatskega sukanja, pripravljen: (A) v digestoriju in (B) izven digestorija.

4.3. VREDNOTENJE IZDELANIH NANOVLAKEN

S pomočjo vrstične elektronske mikroskopije in računalniškega programa ImageJ smo ugotavljali, kako na morfologijo in povprečni premer NV vplivajo:

- ~ uporabljeno topilo (3 % ali 30 % očetna kislina);
- ~ vrsta hitosana (LMW Hit ali zmes LV/LMW Hit v razmerju 1:1 ali MMW Hit);
- ~ vrsta zbirala (aluminijasta folija, gaza, poliuretansko zbiralo TegadermTM);
- ~ prostor, v katerem poteka elektrostatsko sukanje (prostor z ali brez pretoka zraka).

Rezultati povprečnih premerov so prikazani na slikah 22 in 23.

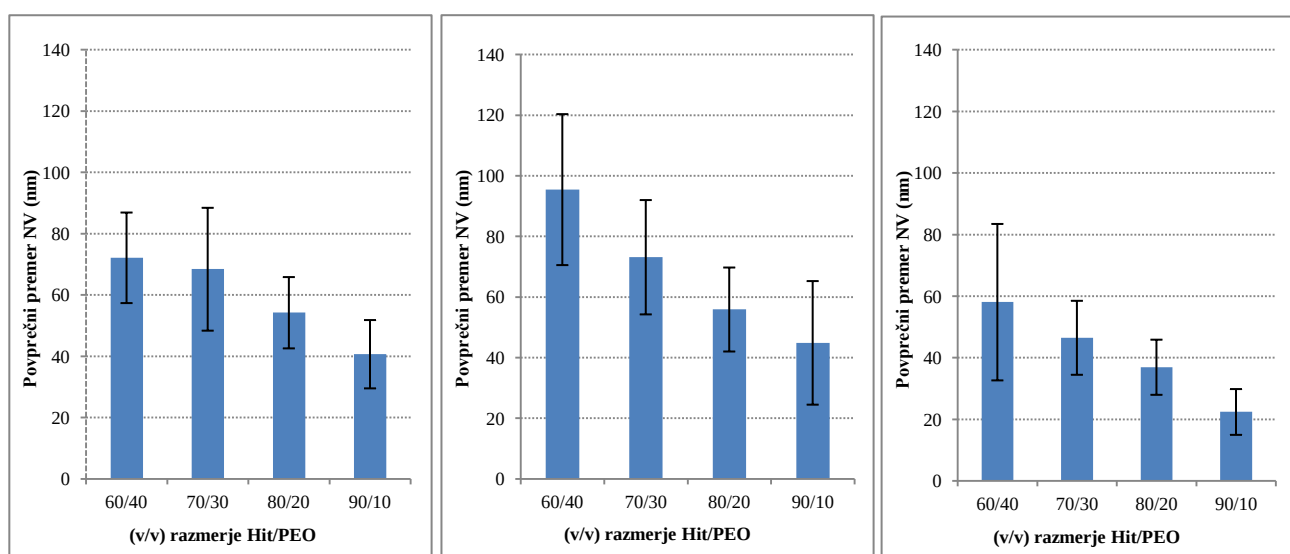


Slika 22: Povprečni premeri NV iz raztopin polimernih zmesi **LMW Hit** in PEO.

(A) topilo: **30 %** očetna kislina, zbiralo: **aluminijasta folija**,

(B) topilo: **30 %** očetna kislina, zbiralo: **gaza**,

(C) topilo: **3 %** očetna kislina, zbiralo: **gaza**.

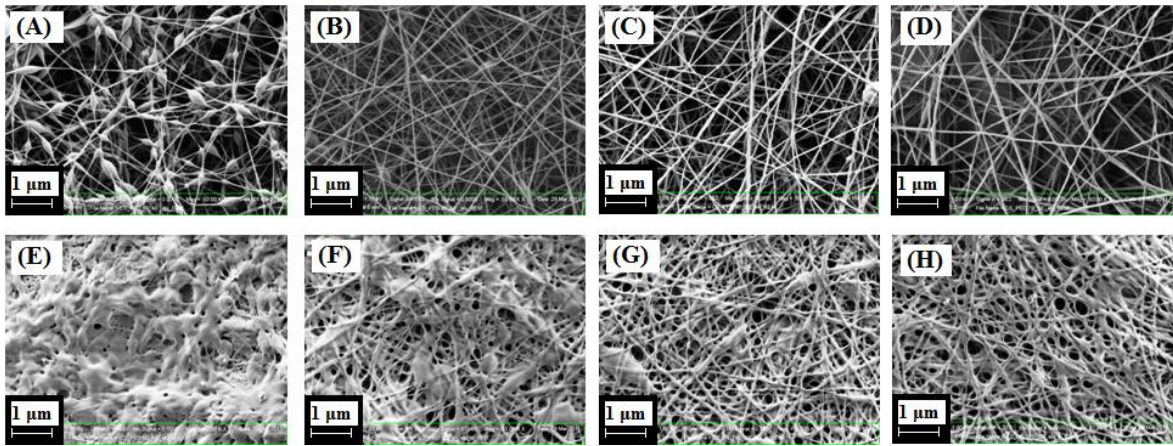


Slika 23: Povprečni premeri NV iz raztopin polimernih zmesi **MMW Hit** in PEO v **3 %** očetni kislini.

(A) zbiralo: **aluminijasta folija**, (B) zbiralo: **gaza** in (C) zbiralo: poliuretansko zbiralo **TegadermTM**.

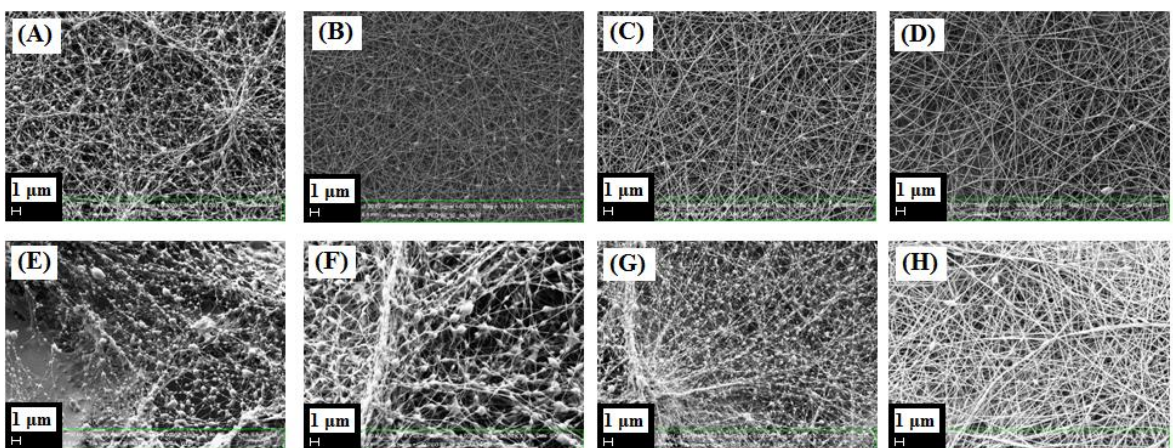
V primeru priprave NV iz zmesi hitosana z nizko molekulsko maso in PEO v 30 % ocetni kislini smo ugotovili, da je najvišje razmerje Hit/PEO, iz katerega s postopkom elektrostatskega sukanja še lahko izdelamo NV, 90/10 (v/v). Pri raztopinah zmesi polimerov, ki vsebujejo več kot 90 % hitosana, se na konici igle ne oblikuje stabilen kontinuiran curek, ampak se pojavijo zgolj kapljice, iz katerih se na zbiralu oblikuje produkt neenakomerne strukture. NV najlepše morfologije smo uspeli pripraviti iz raztopine zmesi Hit/PEO 60/40 (v/v) (slika 24D). Podobno kot v študiji Bhattacharaja (9) se tudi v našem primeru z manjšanjem deleža PEO v zmesi morfologija NV spreminja iz vlaknate v vozlasto in tako v primeru raztopine zmesi Hit/PEO 90/10 (v/v) opazimo največje število vozlov (slika 24A). Po drugi strani slika 22A kaže, da je premer vlaken največji pri vzorcu, ki vsebuje 40 % PEO, in najmanjši pri vzorcu, ki vsebuje 10 % PEO. To pomeni, da se premer vlaken zmanjšuje sorazmerno z zmanjševanjem deleža PEO v polimerni zmesi oz. z naraščanjem števila vozlov. Torej manjši kot je delež PEO, več je vozlov in tanjša so vlakna med njimi.

Ker so vlakna v *in vivo* okolju izpostavljena vlažnemu okolju, je zelo pomembno, da se njihova morfologija po stiku s takšnim okoljem ohrani. Da bi preučili vpliv vlage na morfologijo izdelanih NV in da bi se hkrati znebili še ostankov sotopila organskega izvora (DMSO) in PAS (Triton X-100TM), ki lahko škodljivo vplivata na celice, smo podobno kot v študiji raziskovalca Bhattacharaja in njegovih sodelavcev NV sprali najprej z etanolom, nato z vodo, nazadnje pa še s PBS. Slika 24 prikazuje vzorce NV pred (A-D) in po spiranju (E-H). Rezultati kažejo, da se morfologija vlaken po spiranju spremeni pri vseh razmerjih Hit/PEO. Integriteta NV se v vodnem mediju poruši zaradi vsebnosti vodotopnega polimera PEO v NV, saj se tudi vlakna, izdelana iz čiste polimerne raztopine PEO, v vodi s temperaturo 37 °C v trenutku raztopijo (9). Bhattacharai poroča tudi, da NV, ki vsebujejo 40 % PEO, po 7 dneh v vodnem mediju popolnoma izgubijo fibrilarno strukturo, medtem ko vlakna, ki vsebujejo 10 % PEO, v vodnem okolju še po 1 tednu ohranijo svojo prvotno strukturo (9). Rezultati naših raziskav so v nasprotju s temi ugotovitvami, saj se je morfologija spremenila pri vseh NV ne glede na vsebnost PEO. Pri tem pa je bilo najbolj izrazito porušenje integritete v vodnem mediju opaziti ravno pri tistih NV, ki so vsebovala najmanj PEO, tj. pri NV iz zmesi Hit/PEO 90/10 (v/v) (slika 24E). Do pojava porušanja integritete NV po izpostavitvi vodnemu mediju pa ne sme priti, saj so NV v nadaljnjem *in vitro* testiranju na celičnih linijah podvržena večdnevni stiku s celičnim medijem.



Slika 24: SEM slike NV iz raztopin polimernih zmesi **LMW Hit** in PEO, topilo: **30 %** očetna kislina, zbiralo: **aluminijasta folija**.
NV po izdelavi z razmerjem Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.
NV po spiranju z razmerjem Hit/PEO: (E) 90/10, (F) 80/20, (G) 70/30, (H) 60/40.

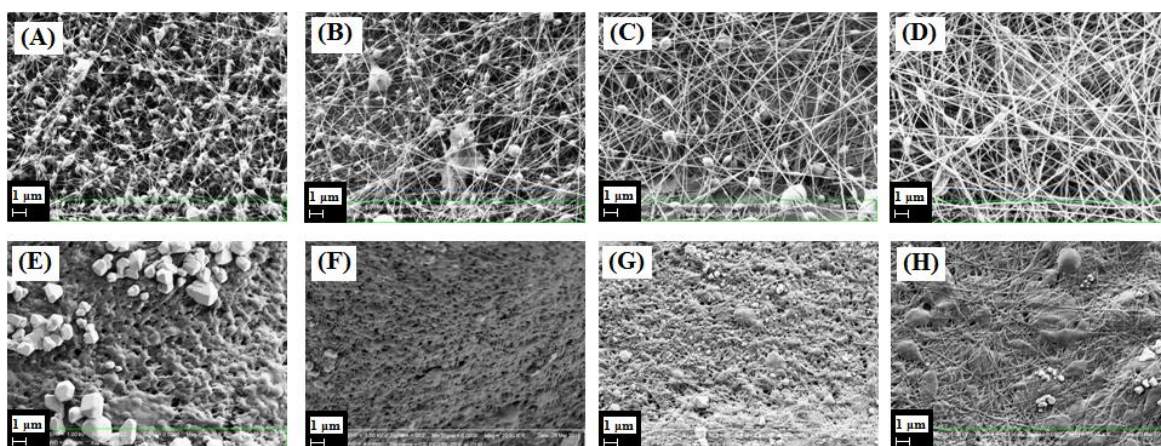
Kot zbiralo smo v poskusih namesto aluminijaste folije uporabili tudi gazo, saj je uporaba le-te uveljavljena pri zdravljenju ran in je s tega vidika bolj primeren tip zbirala kot aluminijasta folija. Slika 25 na posnetkih A-D prikazuje produkte elektrostatskega sukanja z aluminijasto folijo kot zbiralom in na posnetkih E-H gazo kot zbiralom. Rezultati na sliki 25 kažejo, da je gaza v primerjavi z aluminijasto folijo manj primerno zbiralo, saj se vozli pojavijo pri vseh NV ne glede na razmerje Hit/PEO. Poleg tega se pri zamenjavi aluminijaste folije z gazo poveča tudi povprečni premer NV in to za kar 50 % (sliki 22A in B). Podobno kot v primeru uporabe aluminijaste folije tudi na gazi vidimo trend naraščanja premera NV z večanjem deleža PEO v polimerni zmesi.



Slika 25: SEM slike NV iz raztopin polimernih zmesi **LMW Hit** in PEO, topilo: **30 %** očetna kislina, zbiralo: **aluminijasta folija ali gaza**.
NV na aluminijasti foliji z razmerjem Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.
NV na gazi z razmerjem Hit/PEO: (E) 90/10, (F) 80/20, (G) 70/30, (H) 60/40.

Slika 26 prikazuje NV na gazi, ki so izdelana iz istega PEO in hitosana kot v prejšnjem primeru, tj. hitosana nizke molekulske mase, le da smo v tem primeru kot topilo uporabili 3 % očetno kislino. Vidimo, da zamenjava topila ne vpliva bistveno na morfologijo izdelanih NV, saj se v obeh primerih pojavijo vozli. Poleg tega na SEM slikah prvič zasledimo madeže polimerne raztopine (slika 26B). Le-te so verjetno posledica neustrezne izbire spremenljivk elektrostatskega sukanja, zato so posamezne kapljice polimerne raztopine dosegle zbiralo, kar se vidi kot madež. Ob zamenjavi topila se zmanjšajo le povprečni premeri NV (slika 22B in C).

Izdelana NV smo sprali po opisanem postopku kot prej (najprej z etanolom, nato z vodo in nazadnje s PBS) in ugotovili, da tudi ta NV po spiranju izgubijo prvotno morfologijo (slika 26 E-H). Predvidevamo, da je za to kriva prisotnost vodotopnega PEO v vlaknih, po drugi strani pa je sprememba morfologije lahko tudi posledica nabrekanja hitosana z nizko molekulsko maso.



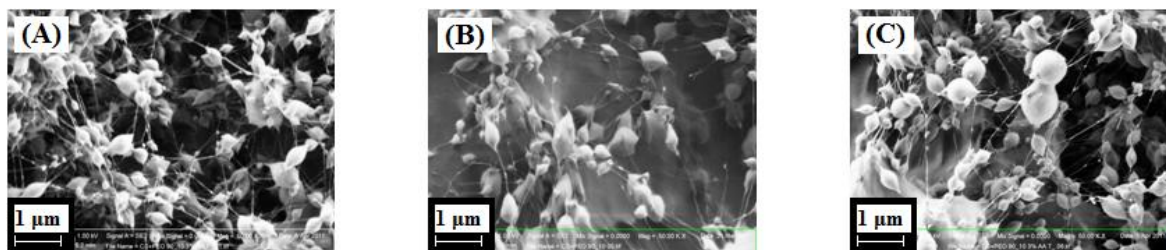
Slika 26: SEM slike NV iz raztopin polimernih zmesi **LMW Hit** in PEO, topilo: **3 % očetna kislina**, zbiralo: **gaza**.

NV po izdelavi z razmerjem Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

NV po spiranju z razmerjem Hit/PEO: (E) 90/10, (F) 80/20, (G) 70/30, (H) 60/40.

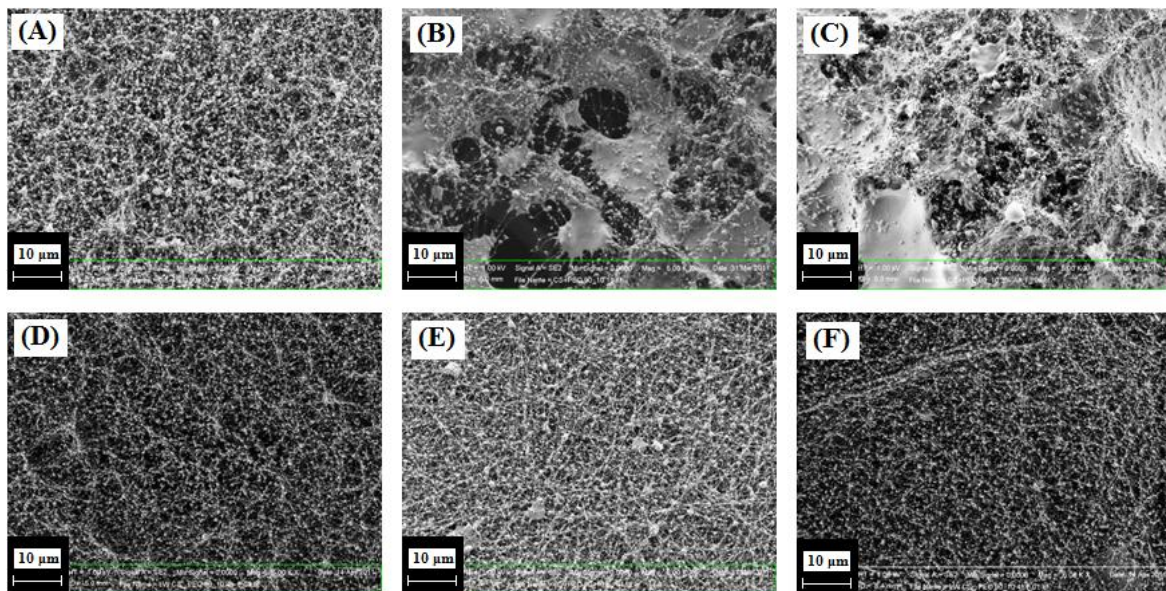
V nadaljevanju smo poskusili izdelati NV brez uporabe Triton X-100TM. Le-ta je za celice škodljiv, saj poruši integriteto njihove membrane in povzroči lizo celic. Kot kaže slika 27, smo na vseh treh zbiralih, tj. na aluminijasti foliji, gazi in poliuretanskem zbiralu TegadermTM, dobili zelo malo vlaken, pa še ta so vsebovala velike vozle. Če pogledamo sliko 28, ki prikazuje vlakna pri manjši povečavi, vidimo, da NV brez Triton X-100TM prekrivajo ogromni madeži posušene polimerne raztopine (A-C), medtem ko imajo NV z dodatkom PAS enotnejšo morfologijo (D-F). Predvidevamo, da je razlog za to prav odsotnost PAS, zaradi česar je bil curek polimerne raztopine na konici igle zelo nestabilen.

Ker je bila površinska napetost polimerne raztopine brez dodatka Triton X-100TM višja kot pri raztopini z dodatkom PAS in ker nismo hkrati povečali še napetosti električnega polja, očitno nismo dobili dovolj stabilnega kontinuiranega curka in posledično tudi NV niso mogla nastati.



Slika 27: SEM slike NV **brez dodatka Triton X-100TM** na treh različnih zbiralih pri večji povečavi.

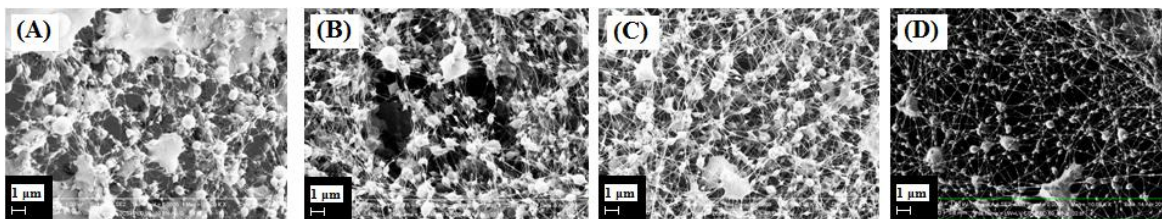
NV so izdelana iz raztopine polimerne zmesi **LMW Hit/PEO** z razmerjem **90/10 (v/v)**, topilo: **3 %** očetna kislina, zbiralo: (A) aluminijasta folija, (B) gaza, (C) poliuretansko zbiralo TegadermTM.



Slika 28: SEM slike **NV z ali brez dodatka Triton X-100TM** na treh različnih zbiralih pri manjši povečavi.

NV so izdelana iz raztopine polimerne zmesi **LMW Hit /PEO** z razmerjem **90/10 (v/v)**, topilo: **3 %** očetna kislina.
NV brez dodanega Triton X-100, zbiralo: (A) aluminijasta folija, (B) gaza, (C) poliuretansko zbiralo TegadermTM.
NV z dodanim Triton X-100, zbiralo: (D) aluminijasta folija, (E) gaza, (F) poliuretansko zbiralo TegadermTM.

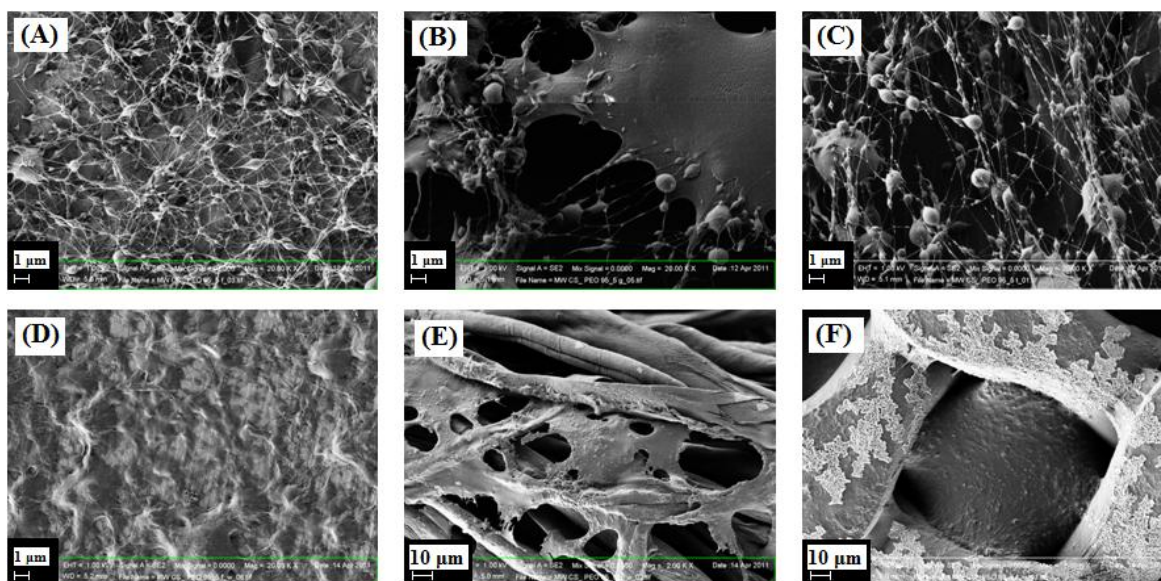
Da bi povečali stabilnost strukture NV v vodnem okolju smo pripravili zmes dveh različnih vrst hitosana in to tako, da je le-ta vsebovala 50 % hitosana nizke molekulske mase in 50 % hitosana nizke viskoznosti, kot topilo pa smo uporabili 3 % očetno kislino. Ko smo pod SEM mikroskopom pogledali produkt elektrostatskega sukanja, smo ugotovili, da v produktu prevladujejo vozli in ne NV (slika 29). Iz tega razloga nadaljnjega spiranja sploh nismo izvedli.



Slika 29: SEM slike NV iz raztopin polimernih zmesi **LMW Hit** in **LV Hit** v razmerju **1:1** ter PEO, topilo: **3 %** očetna kislina, zbiralo: **gaza**, razmerje Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

V nadaljevanju smo poskušali še z uporabo hitosana srednje molekulske mase, kot topilo pa smo uporabili 3 % očetno kislino. Predvidevali smo, da bo hitosan z večjo molekulsko maso v vodnem mediju manj nabrekal in bo v vodi manj topen, posledično pa bodo NV po spiranju ohranila prvotno strukturo. Tako smo pripravili vse prej omenjene raztopine polimernih zmesi z različnimi razmerji Hit/PEO in še novo zmes z najnižjo vsebnostjo PEO, tj. zmes Hit/PEO 95/5 (v/v). S tem smo skušali zmanjšati tudi vpliv vodotopnega PEO, ki vpliva na spremembo morfologije NV po spiranju. Elektrostatsko sukanje smo izvajali z uporabo treh različnih zbiral: aluminijaste folije, gaze in poliuretanskega zbirala TegadermTM. Izdelanim NV smo tudi tokrat določili povprečni premer in jih sprali po opisanem postopku.

Vlakna iz zmesi MMW Hit/PEO 95/5 (v/v) na gazi sploh ne nastanejo, prav tako pa se na zbiralu pojavijo številni madeži posušene polimerne raztopine (slika 30 B). Rezultat kaže, da je za nastanek NV potrebno k raztopini hitosana dodati najmanj 10 % PEO. Po spiranju ni več vidnih NV na nobenem izmed zbiral, kar je verjetno posledica prekratkega časa elektrostatskega sukanja, saj je izdelava NV potekala le 30 minut, zato je bilo produkta malo in se je pri spiranju lahko odstranil (slika 30 D-F).

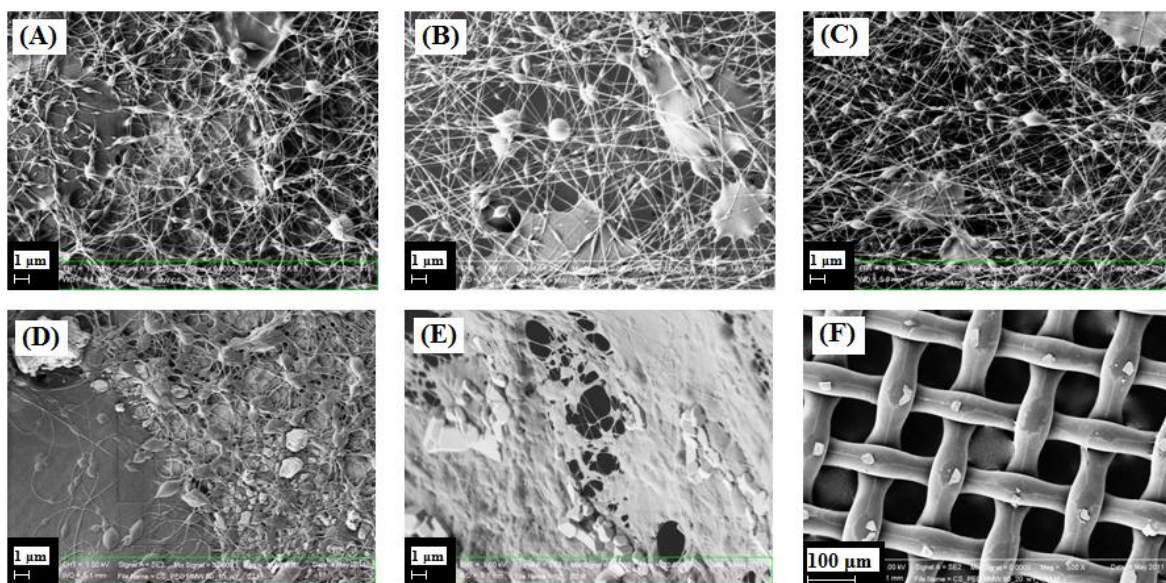


Slika 30: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi **MMW Hit/PEO** z razmerjem **95/5 (v/v)**, topilo: **3 %** očetna kislina.

NV po izdelavi, zbiralo: (A) aluminijasta folija, (B) gaza, (C) poliuretansko zbiralo TegadermTM.

NV po spiranju, zbiralo: (D) aluminijasta folija, (E) gaza, (F) poliuretansko zbiralo TegadermTM.

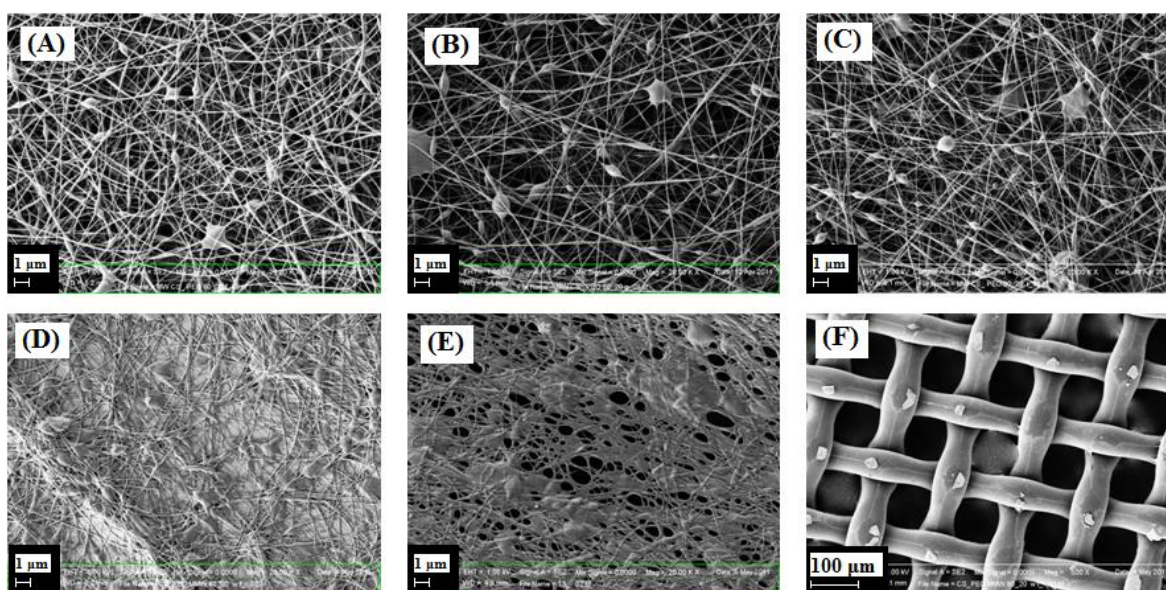
Slike 31, 32, 33 in 34 prikazujejo NV z razmerjem MMW Hit/PEO 90/10, 80/20, 70/30 in 60/40 (v/v). Vidimo lahko, da se na vseh treh zbiralih z večanjem deleža PEO oblikujejo NV lepše morfologije in z manjšim deležem vozlov. Ponovno se največ vozlov pojavlja v primeru gaza kot zbirala, najmanj pa v primeru uporabe aluminijaste folije. Sprana NV na aluminijasti foliji in gazi kljub drugi vrsti hitosana, tj. hitosana srednje molekulske mase, izgubijo prvotno morfologijo in tako so na SEM slikah vidni le njihovi obrisi (D in E na slikah 31, 32, 33, 34), medtem ko se NV na poliuretanskem zbiralu TegadermTM v celoti sperejo neglede na razmerje Hit/PEO (F na slikah 31, 32, 33, 34), kar je velika slabost. Po drugi strani se prednost poliuretanskega zbirala TegadermTM pokaže, če spremljamo premer NV takoj po izdelavi. Premer NV, zbranih na omenjenem poliuretanskem zbiralu, je najmanjši in v primeru NV iz zmesi Hit/PEO 90/10 (v/v) doseže minimalni premer 22,4 nm (slika 23 A-C). Pri vrednotenju premerov smo ugotovili tudi, da se pri uporabi hitosana srednje molekulske mase na aluminijasti foliji zberejo debelejša vlakna kot v primeru NV iz hitosana nizke molekulske mase, kar so potrdili tudi v predhodni raziskavi (15).



Slika 31: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi **MMW Hit/PEO** z razmerjem **90/10 (v/v)**, topilo: **3 %** očetna kislina.

NV po izdelavi, zbiralo: (A) aluminijasta folija, (B) gaza, (C) poliuretansko zbiralo Tegaderm™.

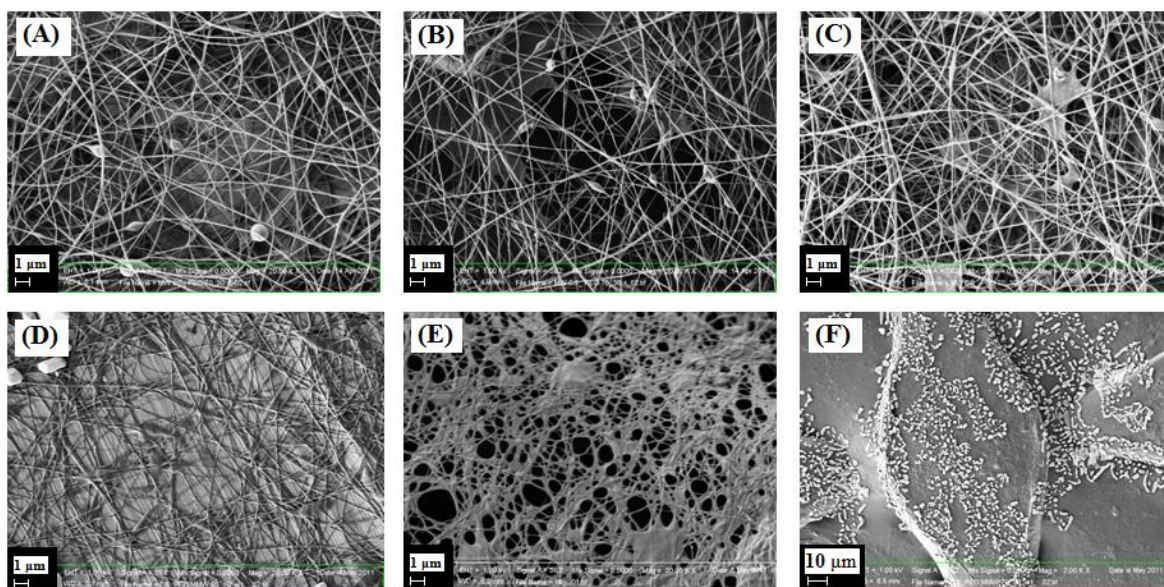
NV po spiranju, zbiralo: (D) aluminijasta folija, (E) gaza, (F) poliuretansko zbiralo Tegaderm™.



Slika 32: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi **MMW Hit/PEO** z razmerjem **80/20 (v/v)**, topilo: **3 %** očetna kislina.

NV po izdelavi, zbiralo: (A) aluminijasta folija, (B) gaza, (C) poliuretansko zbiralo Tegaderm™.

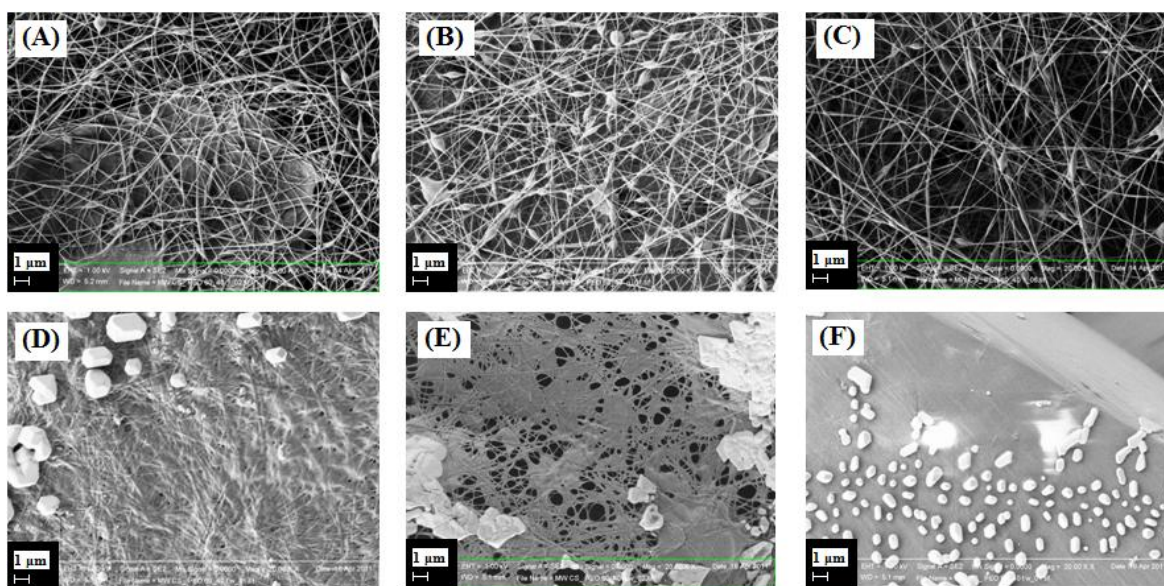
NV po spiranju, zbiralo: (D) aluminijasta folija, (E) gaza, (F) poliuretansko zbiralo Tegaderm™.



Slika 33: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi **MMW Hit/PEO** z razmerjem **70/30 (v/v)**, topilo: **3 %** očetna kislina.

NV po izdelavi, zbiralo: (A) aluminijasta folija, (B) gaza, (C) poliuretansko zbiralo Tegaderm™.

NV po spiranju, zbiralo: (D) aluminijasta folija, (E) gaza, (F) poliuretansko zbiralo Tegaderm™.



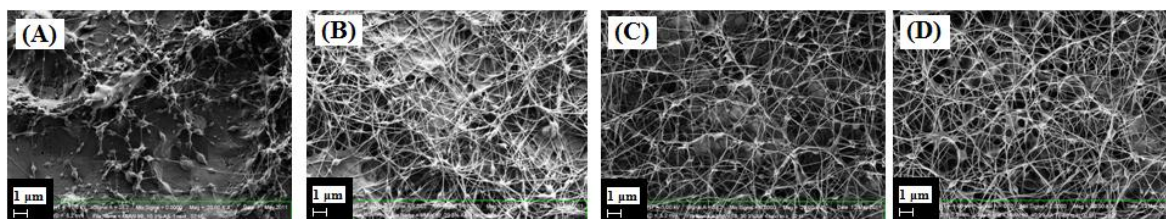
Slika 34: SEM slike NV iz raztopine polimerne zmesi **MMW Hit/PEO** z razmerjem **60/40 (v/v)**, topilo: **3 %** očetna kislina.

NV po izdelavi, zbiralo: (A) aluminijasta folija, (B) gaza, (C) poliuretansko zbiralo Tegaderm™.

NV po spiranju, zbiralo: (D) aluminijasta folija, (E) gaza, (F) poliuretansko zbiralo Tegaderm™.

Za biološko vrednotenje NV *in vitro* smo izdelali NV z različnim razmerjem hitosana srednje molekulske mase in PEO v 3 % očetni kislini in jih zbrali na velikih krovnih stekelcih (22x22 mm). Pri tem smo zbiralo sestavili tako, da smo na aluminijasto folijo s prevodnim trakom nalepili krovna stekelca in s tem zagotovili prevodnost zbirala. Da bi za vrednotenje celičnega odziva dobili zadostno količino NV na krovnih stekelcih,

smo elektrostatsko sukanje izvajali 2 h in nato pod SEM mikroskopom preverili prisotnost in morfologijo izdelanih NV. Slika 35, ki prikazuje NV na aluminijasti foliji tik ob krovnih stekelcih, kaže, da so NV nastala v vseh primerih. Na podlagi tega sklepamo, da se NV nahajajo tudi na krovnih stekelcih in da so le-ta primerna za *in vitro* vrednotenje biološkega odziva celic.

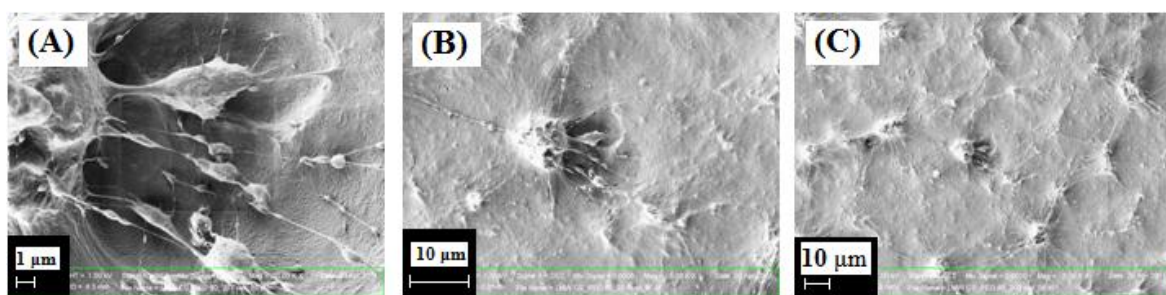


Slika 35: SEM slike NV iz **aluminijaste folije poleg krovnih stekelc.**

NV so izdelana iz raztopin polimernih zmesi **MMW Hit** in PEO, topilo: **3 %** očetna kislina.

Razmerje Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

Da bi preverili tudi odziv celic na NV iz hitosana nizke molekulske mase, smo izdelali še vlakna z različnim razmerjem LMW Hit/PEO v 30 % očetni kislini in jih tudi tokrat zbrali na velikih krovnih stekelcih, ki smo jih s prevodnim trakom nalepili na aluminijasto folijo. Po nekaj minutah elektrostatskega sukanja, ki je potekalo izven digestorija, smo na aluminijasti foliji opazili moker madež. Produkt elektrostatskega sukanja smo zato pogledali pod SEM mikroskopom in ugotovili, da se na predelu mokrega madeža nahaja zgolj polimerna raztopina, iz katere se NV niso uspela tvoriti, saj je le-ta prej dosegla zbiralo (slika 36).



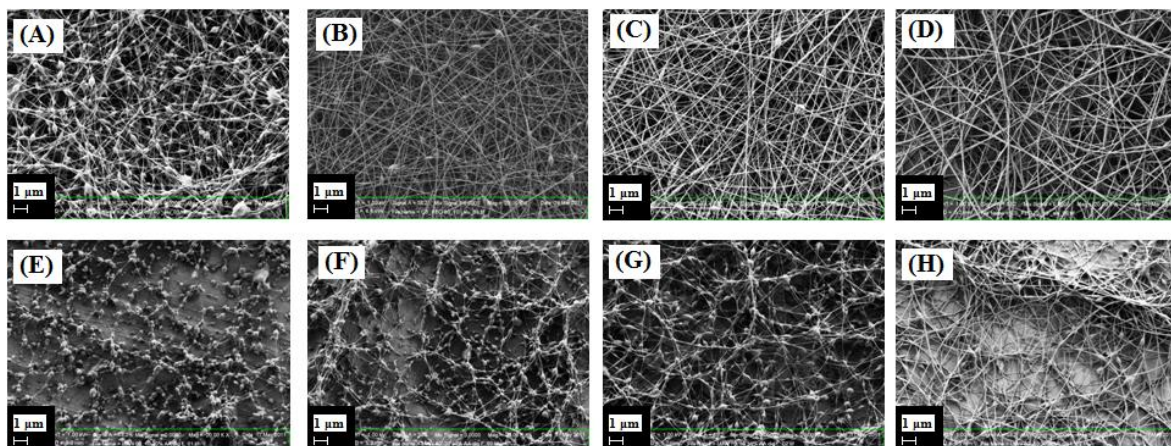
Slika 36: SEM slike vzorca iz **območja mokrega madeža**. Elektrostatsko sukanje je potekalo **izven odsesovalne komore**.

NV so izdelana iz raztopine polimerne zmesi **LMW Hit/PEO** z razmerjem **80/20 (v/v)**, topilo: 30 % očetna kislina, zbiralo:

aluminijasta folija. **Različne povečave:** (A) 20 000-krat, (B) 5 000-krat, (C) 2 000-krat.

Predvidevali smo, da je nastanek mokrega madeža posledica tega, da smo elektrostatsko sukanje izvajali v prostoru brez pretoka zraka, zato smo poskus izdelave NV

ponovili v digestoriju. Ugotovili smo, da je v tem primeru moker madež na zbiralu izginil in na aluminijasti foliji so se zbrala NV (slika 37 E-H). Zaradi tega smo sklepali, da so se NV zbrala tudi na krovnih stekelcih, ki smo jih lahko kasneje uporabili za *in vitro* vrednotenje odziva keratinocitov na izdelana NV.



Slika 37: SEM slike NV iz dveh različnih poskusov.

NV so izdelana iz raztopin polimernih zmesi **LMW Hit** in PEO, topilo: **30 %** očetna kislina, zbiralo: **aluminijasta folija**.

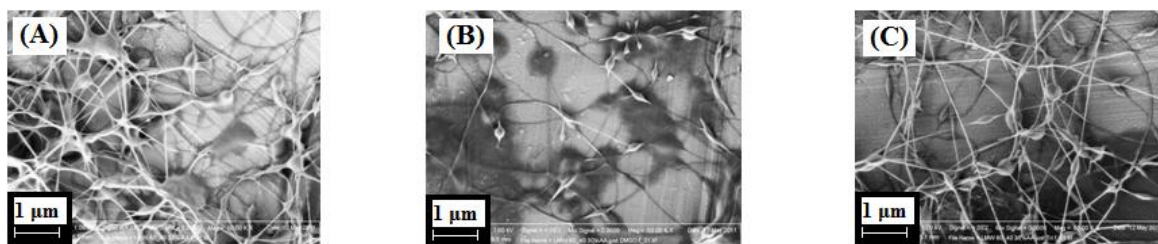
Prvi poskus izdelave NV: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

Drugi poskus izdelave NV: (E) 90/10, (F) 80/20, (G) 70/30, (H) 60/40.

Če primerjamo SEM slike NV, ki smo jih izdelali v prvem poskusu (slika 37 A-D) s tistimi iz ponovljenega poskusa (slika 37 E-H), ugotovimo, da je izdelava NV težko ponovljiv proces, saj NV iz drugega poskusa vsebujejo veliko več vozlov kot pa tista iz prvega poskusa. Očitno na proces elektrostatskega sukanja poleg poznanih dejavnikov vplivajo še določeni neznani, ki jih zato ne moremo nadzorovati.

Vpliv DMSO in Triton X-100TM smo ugotavljali na primeru zmesi nizko molekularnega Hit/PEO 60/40 (v/v), kjer smo dodali le soto pilo ali le PAS. Pri optimizaciji spremenljivk tehnološkega postopka smo imeli veliko težav in čeprav smo spremenljivke elektrostatskega sukanja dolgo časa spreminjali, nikakor nismo mogli vzpostaviti stabilnega kontinuiranega nitastega curka. Kljub temu, da smo elektrostatsko sukanje izvajali v digestoriju, se je pri vzorcu zgolj z dodatkom DMSO pojavil moker madež, ki ga pri elektrostatskem sukanju zmesi zgolj z dodatkom Triton X-100TM nismo opazili. Zato sumimo, da je kotopilo organsega izvora tisto, ki tako počasi izhlapeva, da se NV na poti od konice igle do zbirala zunaj digestorija ne posušijo. Slika 38B in C kaže prisotnost majhnih količin NV tako v primeru polimerne zmesi le z dodatkom DMSO kot tudi v primeru polimerne zmesi le z dodatkom Triton X-100TM, pri čemer oba vzorca vsebujeta

številne vozle. Torej trditev raziskave Bhattaraija in sodelavcev (9), da vozli po dodatku DMSO izginejo, v naših poskusih ni bila potrjena. Če sedaj pogledamo vzorec, kjer sta prisotna oba dodatka (slika 38A), vidimo, da imajo vlakna v tem primeru lepšo morfologijo in manj vozlov. Iz tega lahko zaključimo, da je za uspešen nastanek NV iz zmesi polimerov Hit/PEO nujen dodatek tako DMSO-ja kot tudi Triton X-100.



Slika 38: SEM slike NV z ali brez sotopila (DMSO) oz. PAS (Triton X-100).

NV so izdelana iz raztopine polimerne zmesi **LMW Hit/PEO** z razmerjem **60/40 (v/v)**, topilo: **30 %** očetna kislina, zbiralo: **aluminijasta folija**. NV z dodatkom: (A) DMSO in Triton X-100, (B) le DMSO, (C) le Triton X-100.

4.4. IN VITRO PREVERJANJE CELIČNEGA ODZIVA

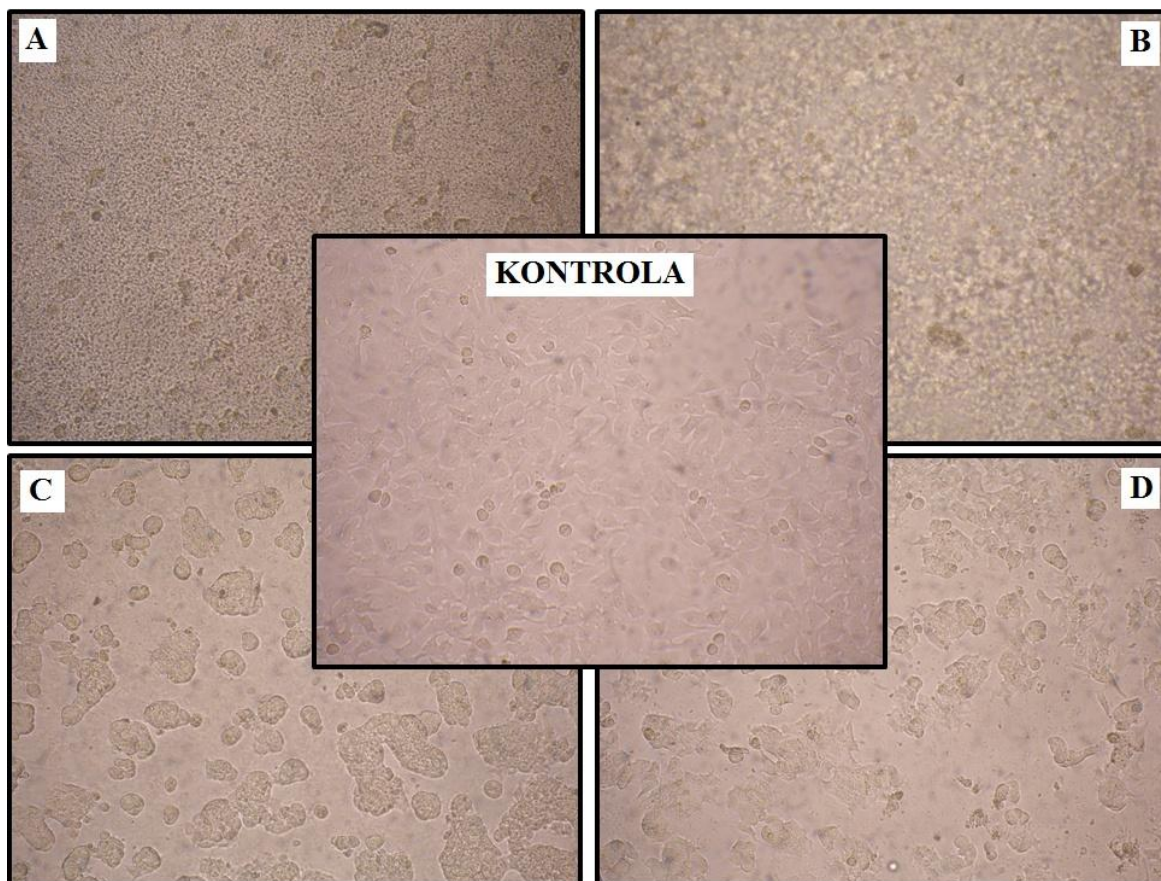
Odziv keratinocitov in njihovo rast na površini NV smo *in vitro* spremljali neposredno v kulturi z invertno svetlobno mikroskopijo in na pripravljenih preparatih s fluorescenčno mikroskopijo. Z njuno pomočjo smo proučevali morfologijo in pritrjanje celic. Če so bili keratinociti vretenaste oblike, smo predvidevali, da so se pritrdili na podlago. Podobno smo sklepali, kadar smo na robovih kroglastih celic opazili izrastke. V primeru, da so bili keratinociti kroglasti in so prosto plavali v mediju, je bil to znak nepritrjenosti. Glede na to, da se hitosanska NV uporabljajo v tkivnem inženirstvu za izdelavo kožnih nadomestkov in sodobnih oblog za rane, je bil naš cilj dokazati pritrjanje keratinocitov na površino NV. Nadalje smo bili pozorni na gostoto celic, ki so rastle na NV, na podlagi katere smo po primerjavi z gostoto kontrolnih celic lahko okvirno ovrednotili rast keratinocitov na mreži NV. Cilj raziskave je bil dokazati, da se celice na površini NV delijo vsaj tako hitro ali hitreje kot na praznem krovnem stekelcu. Na podlagi tega bi lahko zaključili, da NV res pospešujejo rast in razmnoževanje keratinocitov in jih lahko uporabimo tako za izdelavo sodobnih oblog za rane kot tudi za izdelavo kožnih nadomestkov. Ko smo primerjali slike, smo bili pozorni tudi na način celične rasti, kjer smo opazovali, ali keratinociti rastejo posamično ali v skupkih. Nazadnje smo izvedli še MTS test, kjer smo preverjali metabolno aktivnost oz. posredno proliferacijo celic. Ponovno smo želeli dokazati, da je proliferacija celic na površini NV večja kot na

kontrolni površini. To bi pomenilo, da NV res omogočajo hitrejše obnavljanje kožnega tkiva po poškodbi.

4.4.1. Vrednotenje celičnega odziva z invertno svetlobno mikroskopijo

Želeli smo ugotoviti, **kako se keratinociti odzivajo na sam material**, iz katerega so pripravljena NV. V ta namen smo pripravili polimerne filme iz raztopin zmesi hitosana srednje molekulske mase in PEO. Takoj, ko smo v vdolbinice s polimernimi filmi dodali suspenzijo celic v mediju, se je barva medija spremenila, kar je posledica spremembe pH medija. pH indikator, ki je dodan v celični medij, je v bazičnem in nevtralnem roza barve, v kislem pa spremeni barvo v rumeno. Ker se je v našem primeru barva medija spremenila iz roza v rumeno, to pomeni, da se je iz polimernega filma sprostil nekaj, kar je medij zakisalo. Ker smo polimerne filme pripravljali iz raztopin v očetni kislini, je bil verjetno zaostanek očetne kisline tisti, ki je povzročil spremembo pH medija. Pripravljene filme smo 4 dni sušili v digestoriju, kar očitno ni bilo dovolj, da bi topilo popolnoma izhlapelo. Kljub spremembi pH medija smo spremljali odziv celic in opazili, da se keratinociti tudi po 48 h inkubacije niso pritrdili na podlago, ampak so prosto plavali v celičnem mediju. Predvidevamo, da je tudi ta odziv posledica spremembe pH medija zaradi ostankov topila.

Poskus smo nato ponovili s polimernimi filmi iz raztopin zmesi hitosana nizke molekulske mase in PEO, ki smo jih na zraku sušili 1 mesec. V tem primeru se je barva medija ob stiku s polimernimi filmi le rahlo spremenila, kar pomeni, da je v času sušenja 3 % vodna raztopina očetne kisline skoraj v celoti izhlapela. Celice so se v tem primeru v času 48 h pritrdile na podlago in ponekod tudi med seboj, spremenjena pa je bila tudi njihova morfologija (slika 39). Tako na polimernih filmih opazimo skupke celic, ki kažejo kroglasto morfologijo, medtem ko na kontrolnem praznem krovnem stekelcu vidimo posamezne keratinocite vretenaste morfologije. Na polimernih filmih iz zmesi Hit/PEO 70/30 in 60/40 (v/v) celice rastejo v dobro vidnih skupkih (slika 39C in D), v primeru polimernih filmov iz izmesi Hit/PEO 90/10 in 80/20 (v/v) pa so skupki celic slabše vidni (slika 39A in B). Vidimo tudi, da je gostota celic kontrole večja kot v vzorcih s polimernimi filmi, kar kaže, da se celice kontrole hitreje delijo kot celice na polimernih filmih. Iz tega lahko zaključimo, da polimerni filmi iz raztopin zmesi Hit/PEO celic ne ubijejo, upočasnijo pa njihovo rast in razmnoževanje.

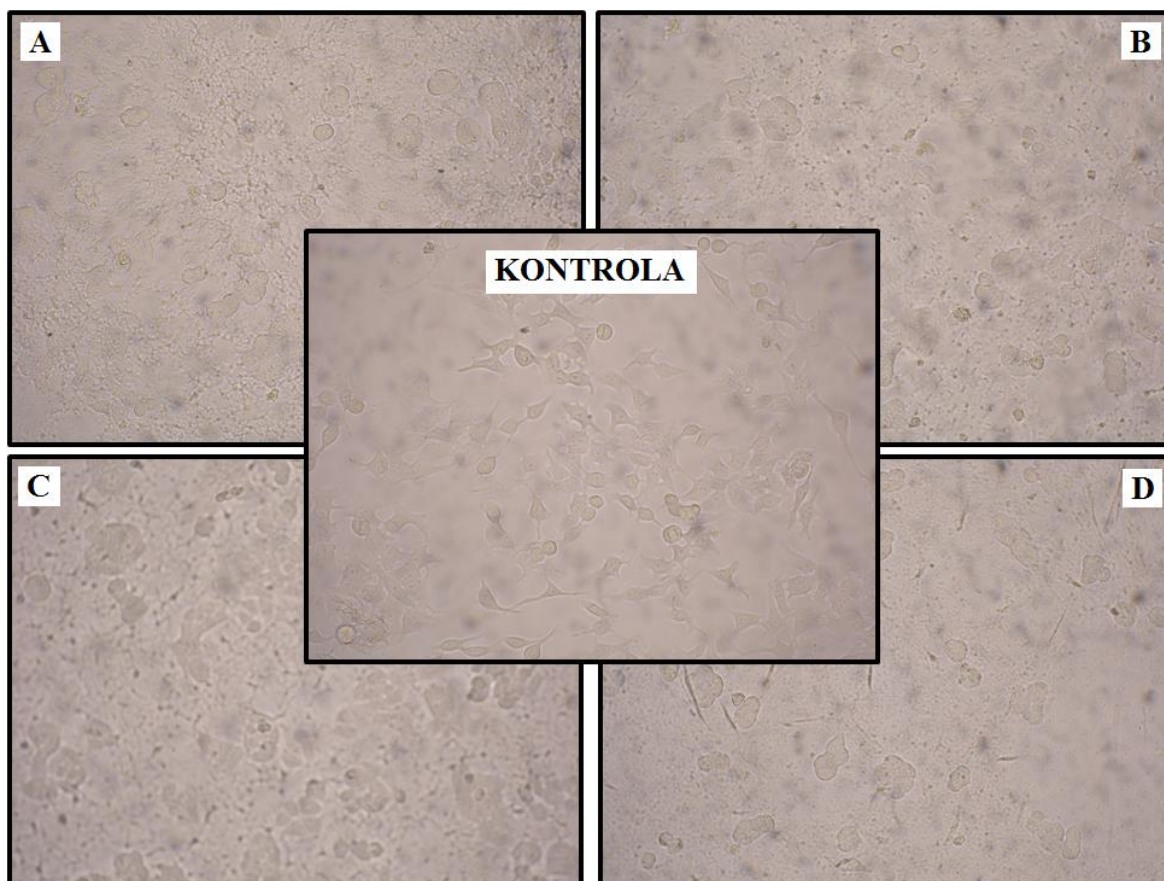


Slika 39: Keratinociti v kulturi po 48 h gojenja na **polimernih filmih** iz raztopin zmesi **LMW Hit** in PEO v 3 % očetni kislini
Razmerje Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

Kontrola so celice, ki so rastle na površini praznega krovnega stekelca. Povečava: 200-krat.

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, kakšen je **vpliv morfologije NV na rast keratinocitov oz. kakšen je odziv keratinocitov na nanotopografijo NV**. V ta namen smo NV iz zmesi hitosana srednje molekulske mase in PEO zbrali na velikih krovnih stekelcih in jih pred poskusom na celicah sušili 2 tedna. Ko smo na površino NV dodali suspenzijo celic v mediju, je medij ohranil roza barvo, kar pomeni, da je topilo v 14 dneh iz NV popolnoma izhlapelo. Opazili smo, da se celice po 48 h pritrdijo na NV in rastejo v kroglastih skupkih (slika 40). Naš rezultat je podoben ugotovitvam predhodne raziskave raziskovalca Bhattaraija in njegovih sodelavcev, v kateri so ugotovili, da se hondroiciti dobro pritrdijo na hitosanska NV (9) in se sklada tudi z rezultati študije skupine raziskovalca Zhou, ki je dokazala, da se mišji fibroblasti uspešno pritrdijo na NV iz zmesi karboksi hitosana in PVA (36). Uspešnost pritrdjanja celic na NV največkrat povezujejo z veliko specifično površino NV, na katero se celice brez težav pritrdijo (9). Pri opazovanju vzorcev smo naleteli na težavo, saj celic ni bilo lahko ločiti od okolice in težko smo videli, kje je meja skupka celic in kje je mreža NV. Kljub temu smo uspeli razbrati, da na

kontrolnem krovnem stekelcu rastejo celice vretenaste morfologije v bolj ločenih otočkih, medtem ko na krovnih steklih z NV rastejo celice v kroglastih skupkih. Med celicami, ki so rastle na NV iz različnih zmesi Hit/PEO, so zelo majhne razlike. Opazili smo le, da so skupki celic največji na NV iz zmesi Hit/PEO 60/40 (v/v) (slika 40D) in najmanjši na NV iz zmesi Hit/PEO 90/10 (v/v) (slika 40A).

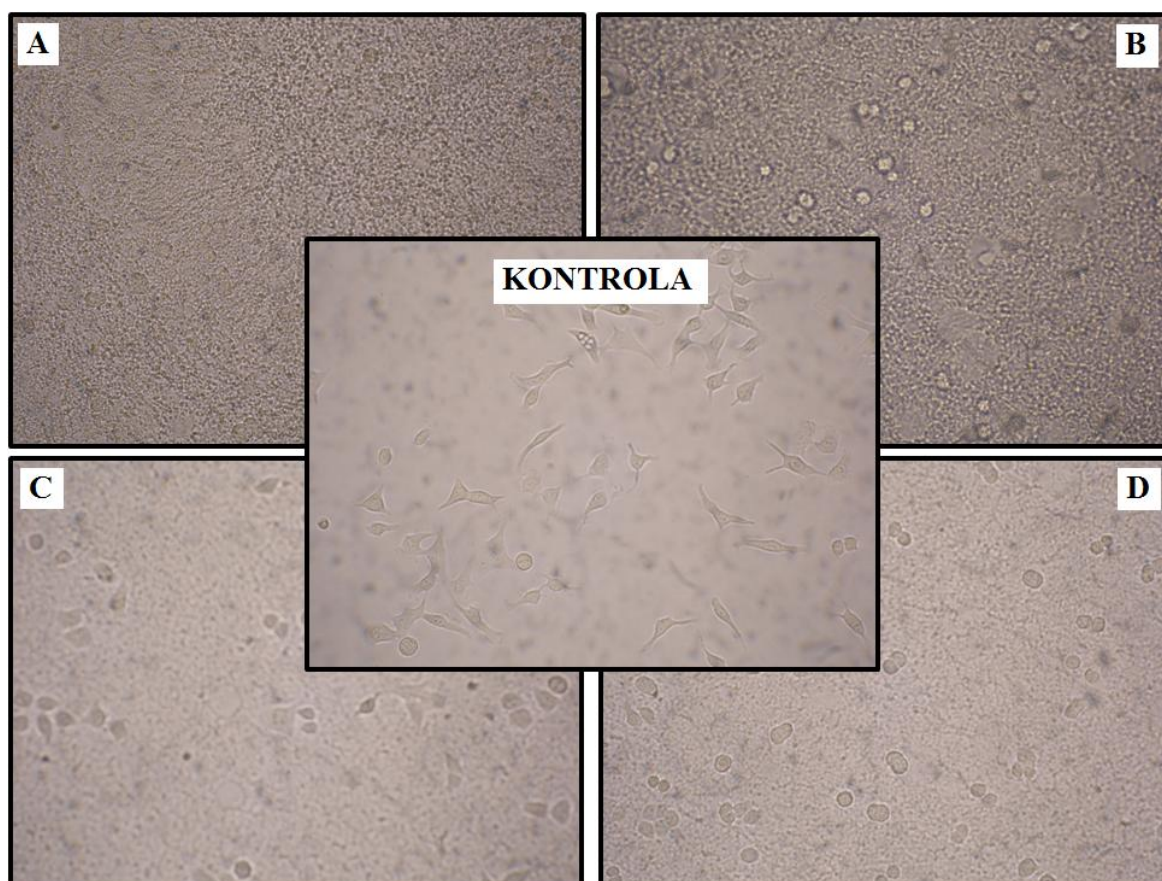


Slika 40: Keratinociti v kulturi po 48 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi **MMW Hit** in PEO v 3 % očetni kislini. Razmerje Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

Kontrola so celice, ki so rastle na površini praznega krovnega stekelca. Povečava: 200-krat.

Poleg vpliva NV iz hitosana srednje molekulske mase smo želeli preučiti še vpliv NV iz hitosana nizke molekulske mase na celično linijo keratinocitov, zato smo na velikih krovnih stekelcih pripravili tudi NV iz zmesi LMW Hit/PEO. Da pa bi hkrati preverili še vpliv spiranja NV z etanolom, s katerim smo se po poročanju raziskovalca Bhattaraija znebili ostankov organskega sotpila in PAS (9), smo naredili naslednja dva poskusa. Prva krovna stekelca z NV smo pred inkubacijo s celicami sprali tako z etanolom kot tudi s PBS, druga pa le s PBS. Celice smo spremljali 96 h. Morfologija keratinocitov po 24 h gojenja na NV, spranih le s PBS (slika 41) in tistih, ki so rastli na NV, spranih tako s PBS

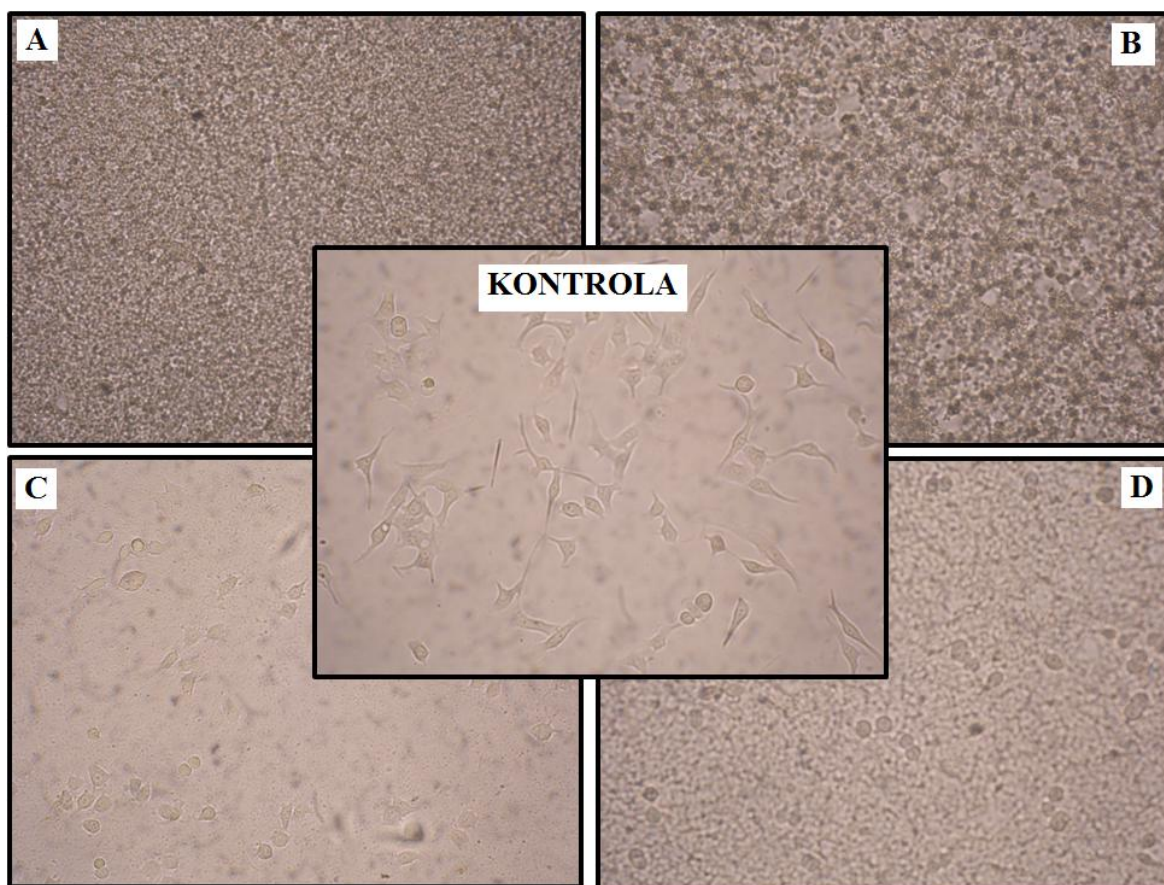
kot tudi z etanolom (slika 42), je zelo podobna. Iz tega lahko zaključimo, da postopek spiranja NV ne vpliva na kasnejšo rast celic. Celice na vseh NV iz hitosana nizke molekulske mase podobno kot na NV iz hitosana srednje molekulske mase rastejo v skupkih s tipično kroglasto morfologijo. Na podlagi tega lahko zaključimo, da tudi molekulska masa hitosana, iz katerega so NV izdelana, nima vpliva na rast in razmnoževanje celic. Keratinociti, rastoči na NV iz zmesi LMW Hit/PEO z razmerji 90/10 in 80/20 (v/v) (slika 41A, B in slika 42A, B), so precej slabo vidni in jih je težko ločiti od okolice. Opazimo pa, da je morfologija celic, ki rastejo na NV iz zmesi LMW Hit/PEO z razmerjem 70/30 (v/v) (slika 41 in slika 42C), najbolj podobna morfologiji kontrolnim celicam. Večina keratinocitov na NV z razmerjem Hit/PEO 70/30 (v/v) po 24 h gojenja še vedno izkazuje kroglasto morfologijo, pri določenih celicah pa je že opazna sprememba morfologije iz kroglaste v vretenasto. To je vidno pri obeh vzorcih ne glede na način spiranja.



Slika 41: Keratinociti v kulturi po 24 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini. NV so bila predhodno sprana samo s PBS.

Razmerje Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

Kontrola so celice, ki so rastle na površini praznega krovnega stekelca. Povečava: 200-krat.

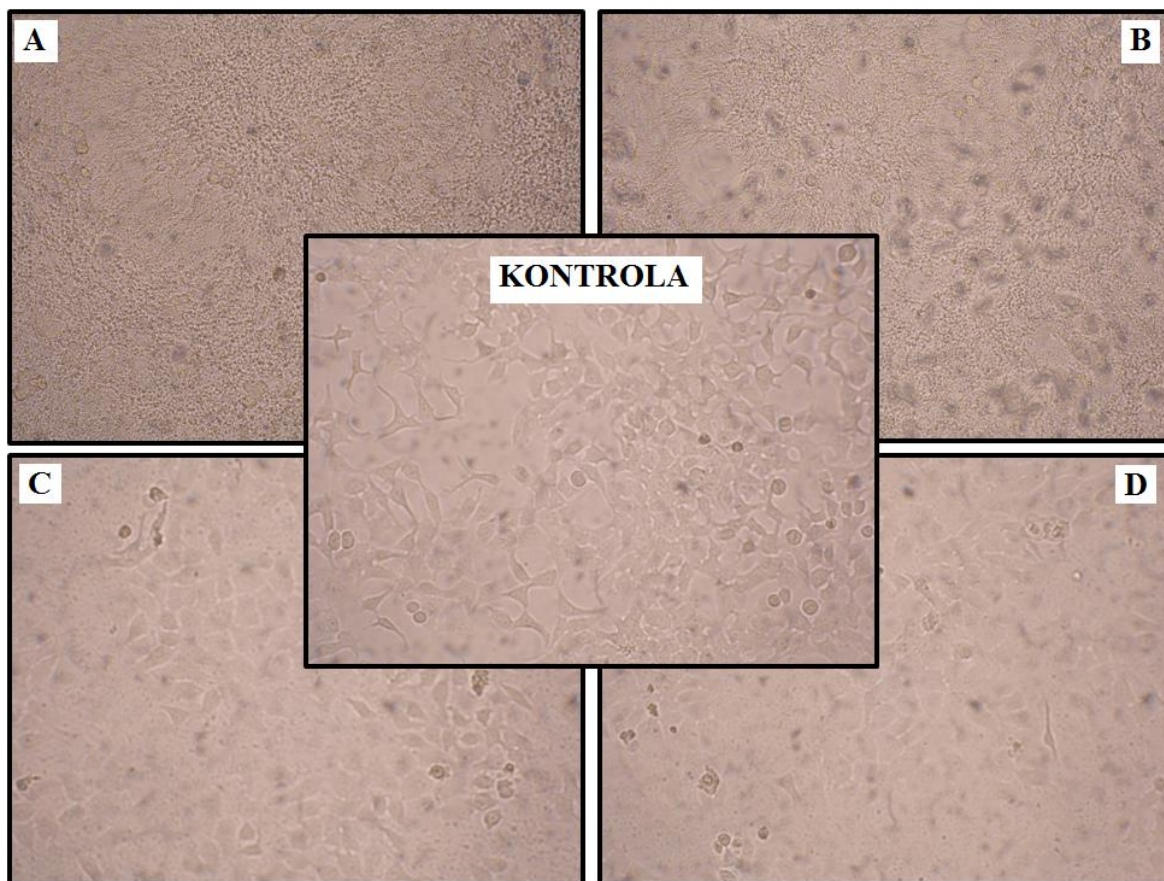


Slika 42: Keratinociti v kulturi po 24 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini. NV so bila predhodno sprana z etanolom in PBS.

Razmerje Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

Kontrola so celice, ki so rastle na površini praznega krovnega stekelca. Povečava: 200-krat.

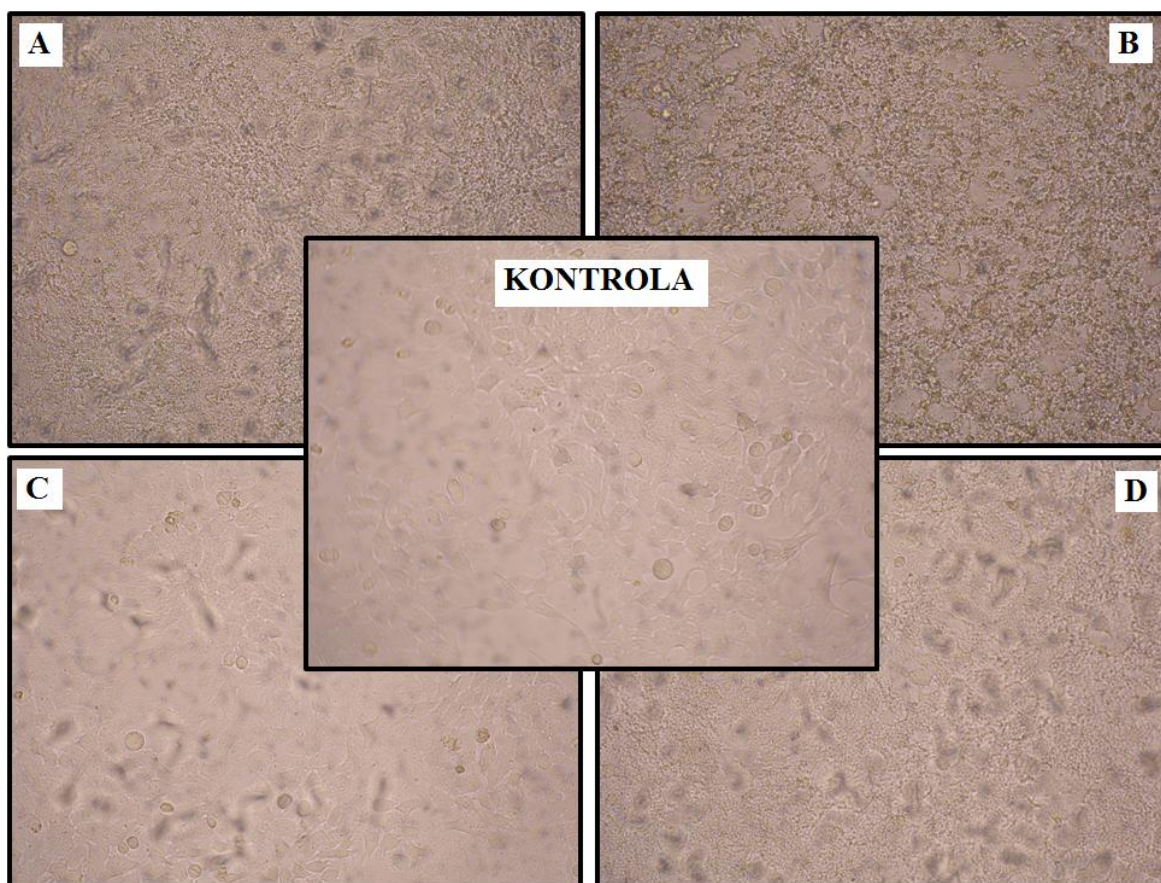
Po 96 h rasti so keratinociti v kontroli dosegli že zelo visoko konfluentnost. Keratinociti, rastoči na NV iz zmesi LMW Hit/PEO z razmerji 90/10 in 80/20 (v/v) (slika 43A, B in slika 44A, B), so ponovno slabo vidni in jih je težko ločiti od mreže NV. Opazili pa smo, da so celice, ki so rastle na NV iz zmesi Hit/PEO 70/30 (v/v) po 96 h v kulturi spremenile morfologijo iz kroglaste v vretenasto, kar pomeni, da so postale podobne celicam kontrole (slika 43C in slika 44C). Celice na ostalih NV so ohranile prvotno bolj kroglasto obliko skupkov. Vpliva spiranja NV z etanolom na rast keratinocitvo nismo opazili niti po 96 h inkubacije. Iz vsega tega lahko zaključimo, da etanol, ki ga uporabimo med postopkom spiranja NV, ne vpliva na keratinocite in da so za pospešitev celjenja ran najbolj primerna NV, ki vsebujejo 70 % hitosana in 30 % PEO.



Slika 43: Keratinociti v kulturi po 96 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini. NV so bila predhodno sprana samo s PBS.

Razmerje Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

Kontrola so celice, ki so rastle na površini praznega krovnega stekelca. Povečava: 200-krat.



Slika 44: Keratinociti v kulturi po 96 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi **LMW Hit** in PEO v 3 % očetni kislini. NV so bila predhodno **sprana z etanolom in PBS**.

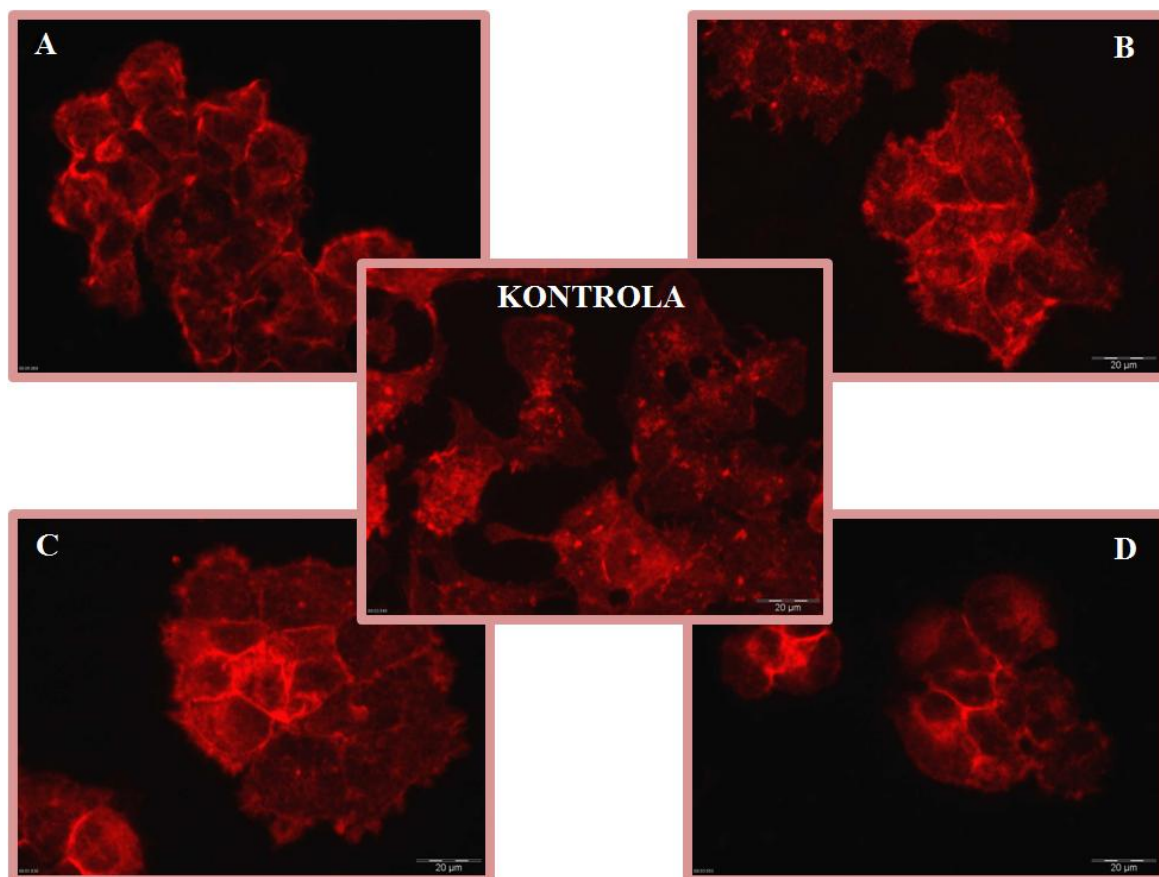
Razmerje Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

Kontrola so celice, ki so rastle na površini praznega krovnega stekelca. Povečava: 200-krat.

4.4.2. Vrednotenje celičnega odziva s fluorescenčno mikroskopijo

Morfologijo, pritrjanje, gostoto in način rasti celic (posamično/v skupini) smo opazovali tudi s fluorescenčno mikroskopijo, pri tem pa smo bili dodatno pozorni še na jedra. Le-ta so bila na slikah fluorescenčne mikroskopije modro obarvana, za razliko od rdeče obarvanih aktinskih filamentov, ki predstavljajo strukturo celičnega citoskeleta. Slika 45 prikazuje keratinocite v kulturi po 72 h gojenja na NV iz zmesi hitosana srednje molekulske mase in PEO. Na njej jasno vidimo rast kroglastih celic v velikih skupkih, za razliko od kontrole, kjer vretenasti keratinociti rastejo v bolj ločenih otočkih. Kljub dejstvu, da celice na mreži NV izkazujejo spremenjeno morfologijo, lahko trdimo, da so pritrjene, saj so za keratinocite značilni številni izrastki, opazni na obrobju skupka večih celic. IZRASTKI SO NAJDAJŠI IN ZATO TUDI NAJBOLJ OPAZNI PRI KERATINOCITIH, KI SO RASTLI NA NV IZ ZMESI Hit/PEO 70/30 (v/v). Rezultati so skladni z ugotovitvami pregleda vzorcev pod invertnim svetlobnim mikroskopom in se ujemajo tudi z rezultati predhodne raziskave

Bhattaraija in sodelavcev (9). Tudi tu pritrjanje celic na podlago dokazujejo s prisotnostjo filopodijev oz. tankih šilastih psevdopodijev in s prisotnostjo številnih dolgih mikrovilov na površini celic.

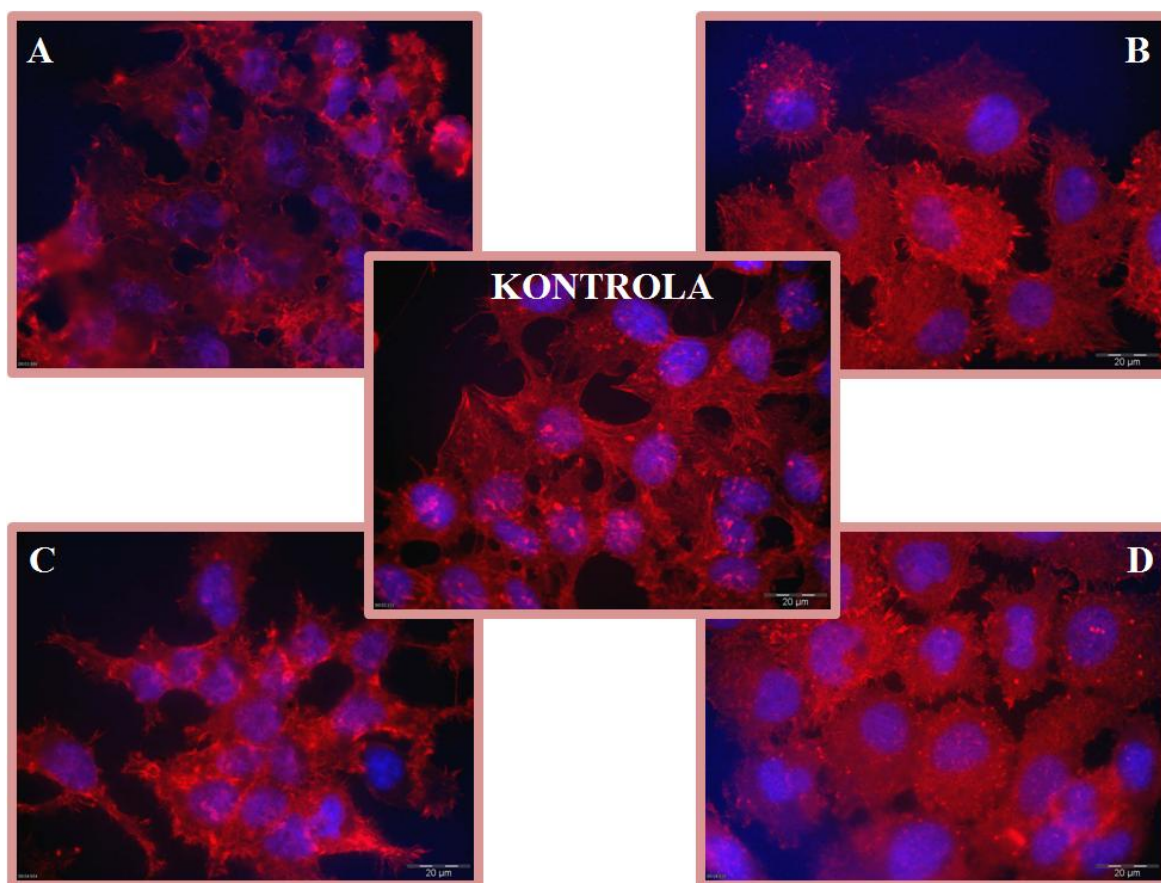


Slika 45: Keratinociti v kulturi po 72 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi **MMW Hit** in PEO v 3 % očetni kislini.

Razmerje Hit/PEO: (A) 90/10, (B) 80/20, (C) 70/30, (D) 60/40.

Kontrola so celice, ki so rastle na površini krovnega stekelca.

Slika 46 prikazuje keratinocite v kulturi po 72 h gojenja na NV iz zmesi hitosana z nizko molekulsko maso in PEO. Keratinociti na mreži NV iz zmesi Hit/PEO 70/30 (v/v) (slika 46C) so tako po velikosti kot tudi po morfologiji celic še najbolj podobni celicam kontrole. Pri obeh vzorcih je opazna vretenasta morfologija celic, ki se med seboj in na podlago pritrjajo s številnimi dolgimi izrastki. Razliko opazimo edino v medsebojni oddaljenosti jeder, ki je večja v primeru keratinocitov kontrole kot pa v primeru keratinocitov na mreži NV, kar kaže na to, da se celice na mreži NV med seboj povežejo v bolj tesne skupke.



Slika 46: Keratinociti v kulturi po 72 h gojenja na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit in PEO v 3 % očetni kislini.

Razmerje Hit/PEO: (A) 90/10 (B) 80/20 (C) 70/30 (D) 60/40.

Kontrola so celice, ki so rastle na površini krovnega stekelca.

Tako lahko tudi na podlagi rezultatov fluorescenčne mikroskopije zaključimo, da so za izdelavo kožnih nadomestkov in sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran najbolj obetavna NV, ki vsebujejo 70 % hitosana in 30 % PEO, saj so keratinociti, ki rastejo na njih, še najbolj podobni celicam kontrole, ki rastejo na praznem krovnem stekelcu.

4.4.3. Vrednotenje metabolne aktivnosti celic na nanovlaknih z MTS testom

Želeli smo ugotoviti vpliv NV na proliferacijo celic, zato smo izvedli MTS test. V ta namen smo NV izdelali iz različnih zmesi hitosana nizke molekulske mase in PEO v 30 % očetni kislini in jih na podoben način kot pri velikih krovih stekelcih sedaj zbrali na majhnih krovih stekelcih. Le-ta smo kasneje nameravali prenesti v vdolbinice mikrotitrne plošče in na njih gojiti celice. Pri prenosu smo naleteli na težavo, saj se nam je malo krovno steklece pri spuščanju v vdolbinico mikrotitrne plošče obračalo. Zato nismo bili popolnoma prepričani, ali je proti vrhu zares obrnjena prava stran krovnega stekelca z NV, na katerih naj bi rastli keratinociti. Poleg tega smo prenos opravljali v komori z

laminarnim pretokom zraka, zato so zračni tokovi še dodatno pripomogli k obračanju prelahkega krovnega stekelca. Težavo smo skušali rešiti tako, da smo izvedbo testa modificirali. NV iz zmesi nizkomolekularnega hitosana in PEO z razmerjem 70/30 (v/v) smo zbrali na velikem krovnem stekelcu in na njem 72 h gojili keratinocite. Test smo torej izvedli na tistih NV, ki so se pri gojenju keratinocitov predhodno izkazala kot najbolj obetavna. Po 72 h v kulturi smo celice tripsinizirali, da bi jih ločili od podlage in tudi med seboj ter tako pripravili suspenzijo celic. V nasprotju s pričakovanjem se celice niti po 10 min inkubiranju pri 37 °C niso popolnoma ločile od podlage. Kljub temu smo izvedbo testa nadaljevali in ugotovili, da je absorbanca vzorca precej nižja od absorbance kontrole (preglednica VIII). Rezultat je verjetno posledica tega, da v vzorec za izvedbo MTS testa nismo uspeli prenesti vseh celic, kar smo spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Po drugi strani pa je bila ta ugotovitev znak, da so se keratinociti res močno vključili v strukturo NV in mogoče tesno vpletli oz. razrastle tudi v nižje plasti NV. To pa tudi pomeni, da so NV iz zmesi Hit/PEO res primerna tako za izdelavo sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran kot tudi za izdelavo kožnih nadomestkov.

Preglednica VIII: Rezultati MTS testa na NV iz raztopin polimernih zmesi LMW Hit/PEO z razmerjem 70/30 (v/v) v 30 % ocetni kislini.

	Povprečna absorbanca	Povprečna absorbanca z odštetim ozadjem	Relativna viabilnost: A (vzorca) / A (kontrole)
VZOREC: Suspenzija celic , ki so rastle na krovnem steklcu z NV	1,1089	0,2275	0,2426
OZADJE VZORCA: Medij brez celic , ki je prikrival krovno stekelce z NV	0,8814		
KONTROLA Suspenzija celic , ki so rastle na krovnem steklcu brez NV	1,0899	0,9376	1,0000
OZADJE KONTROLE: Medij brez celic , ki je prikrival krovno stekelce brez NV	0,1523		

5. SKLEP

V diplomski nalogi smo s postopkom elektrostatskega sukanja iz zmesi Hit in PEO izdelovali NV. Pred elektrostatskim sukanjem smo najprej ovrednotili spremenljivke polimernih raztopin in prišli do naslednjih zaključkov: 1.) raztopine hitosana srednje molekulske mase imajo večjo površinsko napetost in viskoznost kot raztopine hitosana nizke molekulske mase; 2.) dodatek PEO v raztopino hitosana po eni strani zmanjša prevodnost in površinsko napetost raztopine, po drugi strani pa zviša njeno viskoznost; 3.) glede na proučevane spremenljivke polimerne raztopine dodatek Triton X-100TM najbolj vpliva na površinsko napetost, dodatek DMSO pa najbolj vpliva na prevodnost raztopine polimerne zmesi.

Glede na dobljene rezultate smo nato določili spremenljivke tehnološkega postopka. V našem primeru smo med konico igle in zbiralom vedno uporabljali razdaljo 18 cm, nato pa smo glede na uporabljen sistem (LMW Hit oz. MMW Hit, ki je raztopljen v 3 % oz. 30 % očetni kislini) spreminjali napetost generatorja od 20 do 24 kV in pretok črpalke od 0,6 do 1,2 mL/h, da je nastal stabilen kontinuiran curek polimerne raztopine. Ugotovili smo, da so za elektrostatsko sukanje najprimernejše polimerne zmesi iz LMW Hit in PEO, ki ju raztopimo v 3 % očetni kislini. Takšne raztopine so dovolj prevodne, da z generatorjem visoke napetosti na njih ustvarimo naboj določene polarnosti, imajo ustrezno površinsko napetost, zaradi česar se na konici igle oblikuje stabilen curek, po enem tednu pa se njihova viskoznost ustali, torej dobimo spremenljivko, ki je konstantna, kar vpliva na ponovljivost procesa elektrostatskega sukanja.

Izdelana NV smo ovrednotili takoj po izdelavi in po spiranju ter prišli do naslednjih ugotovitev: 1.) NV najlepše morfologije smo pripravili iz zmesi LMW Hit in PEO, ki smo ju raztopili v 30 % očetni kislini; 2.) za nastanek NV je k raztopini hitosana potrebno dodati najmanj 10 % PEO; 3.) z zmanjševanjem deleža PEO v zmesi se morfologija NV spreminja iz vlaknate v vozlasto, hkrati pa se manjša tudi premer vlaken od 100 do 20 nm; 4.) izdelava NV brez dodatka Triton X-100TM in DMSO je manj uspešna, saj dobimo predvsem vozle in le zelo majhne količine NV; 5.) med proučevanimi zbiralci se je kot najboljša izkazala aluminijasta folija, saj so se vlakna iz poliuretanskega zbiralca TegadermTM po izpostavitvi vodnemu mediju takoj sprala, vlakna, zbrana na gazi, pa so imela veliko vozlov; 6.) morfologija vseh NV, ne glede na vrsto hitosana, se po spiranju spremeni; najbolj izrazito spremembo integritete v vodnem mediju pa smo opazili pri NV z najmanjšim deležem PEO; 7.) za uspešno izdelavo NV je elektrostatsko sukanje potrebno

izvajati v prostoru z odzračevanjem, saj se v nasprotnem primeru vzorec do zbirala ne posuši in na zbiralu se pojavi moker madež; 8.) izdelava NV je težko ponovljiv proces, saj nanj vpliva vrsta znanih in neznanih spremenljivk.

V sklopu *in vitro* biološkega vrednotenja odziva keratinocitov na izdelana NV smo ugotovili, da molekulska masa hitosana, iz katerega izdelamo NV, nima vpliva na rast keratinocitov. Podobno velja tudi za spiranje z etanolom. Po drugi strani smo ugotovili, da zaostanek očetne kisline v slabo posušeni NV povzroči spremembo pH medija, v katerem so rastle celice, zaradi česar se keratinociti tudi po 48 h gojenja v kulturi niso pritrdili na podlago, ampak so prosto plavali v celičnem mediju. S pomočjo invertne svetlobne mikroskopije smo ugotovili, da na polimernih filmih rastejo skupki celic, ki kažejo bolj kroglasto morfolologijo, medtem, ko na kontrolnem praznem krovnem stekelcu rastejo keratinociti vretenaste morfolologije. Ugotovili smo, da celice, ki rastejo na NV iz zmesi LMW Hit/PEO 70/30 (v/v), po 96 h v kulturi spremenijo morfolologijo iz kroglaste v vretenasto, kar pomeni, da postanejo podobne celicam kontrole. S pomočjo fluorescenčne mikroskopije smo ugotovili tudi, da so celični zrastki oz. filopodiji najdaljši in zato tudi najbolj opazni pri keratinocitih, ki rastejo na NV iz zmesi Hit/PEO 70/30 (v/v). Na teh najbolj obetavnih NV smo nazadnje s pomočjo MTS testa želeli posredno preveriti še proliferacijo celic. Dobljeni rezultati testa niso zanesljivi, kajti v vzorec za izvedbo MTS testa nismo uspeli prenesti vseh celic, kar smo spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Po drugi strani pa je bila ta ugotovitev znak, da se keratinociti res močno vključijo v mrežo NV, se z NV tesno povežejo in vrastejo tudi v nižje plasti NV. To pa tudi pomeni, da so NV, izdelana iz 70 % LMW Hit in 30 % PEO, res primeren kandidat za izdelavo sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran kot tudi za izdelavo kožnih nadomestkov.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno še bolj natančno preučiti vpliv spremenljivk polimerne raztopine in tehnološkega postopka na izdelavo hitosanskih NV, da bi lahko z veliko verjetnostjo napovedali, kakšen bo produkt elektrostatskega sukanja. S tem bi lahko dosegli večjo ponovljivost procesa in tako omogočili industrijsko izdelavo hitosanskih NV, ki bi bila primerna za vsakodnevno uporabo v biomedicini. Tudi *in vitro* vrednotenje na celičnih kulturah bi bilo smiselno razširiti na 3D kožne nadomestke in raziskati, ali se hitrost celjenja modelnih ran v prisotnosti NV pospeši.

6. LITERATURA

1. Seeram R, Kazutoshi F, Wee-Eong T, Teik-Cheng L, Zuwei M: An introduction to electrospinning and nanofibres. World scientific, 2005, 382 strani.
2. Rošić R, Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J: Electrospun hydroxyethyl cellulose nanofibres: the relationship between structure and proces. J. Drug Del. Sci. Tech 2011; 21: 229-236.
3. Kumbar S, Nukavarapu S, James R, Hogan M, Laurencin C: Recent patents on electrospun biomedical nanostructures: an overview. Recent patents on biomedical engineering 2008; 1: 68-78.
4. Beachley V, Wen X: Polymer nanofibrous structures: fabrication, biofunctionalisation and cell interaction. Progress in polymer science 2010; 35: 868-892.
5. Yu DD, Zu LM, White K, Branford-White C: Electrospun nanofiber-based drug delivery systems. Health 2009; 1 (2):67-75.
6. Jayakumar R, Prabakaran M, Kumar PT, Nair SV, Tamura H: Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology Advances 2011; doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.005.
7. Rutledge G, Fridrikh S: Formation of fibers by electrospinning. Advanced Drug Delivery Reviews 2007; 59: 1384-1391.
8. Sill T, Recum H: Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials 2008; 29: 1989-2006.
9. Bhattarai N, Edmondson D, Veiseh O, Matsen, Zhnag M: Electrospun chitosan-based nanofibres and their cellular compatibility. Bionaterials 2005; 26: 6176-6184.
10. Tiwari SK, Tzezana R, Zussman E, Venkatraman: Optimizing partition-controlled drug release from electrospun core-shell fibers. International Journal of Pharmaceutics 2010; 392: 209-217.
11. Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH: Bending instability on electrospinning of fibres. J Appl Phys 2001; 89 (5): 3018-3026.
12. Doshi J, Reneker DH: Electrospinning process and applications of electrospun fibres. J Electrostat 1995; 35: 151-156.
13. Chong E, Phan T, Lim I, Zhang Y, Bay B, Ramakrishna S, Lim C: Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal

- reconstitution wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia* 2007; 3: 321–330.
14. Bhardwaj N, Kundu SC: Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances* 2010; 28 (3): 325-347.
 15. Ziani K, Henrist C, Jerome C, Sqil A, Mate I, Cloots R: Effect of nonionic surfactant and acidity on chitosan nanofibres with different molecular weights. *Carbohydrate polymers* 2011; 83: 470-476.
 16. Hohman MM, Shin M, Rutledge G, Brener MP: Electrospinning and electrically forced jets. *Applications Phys Fluids* 2001; 13: 221-36.
 17. Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B: Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membrane. *Polymer* 2002; 43: 4403-4412.
 18. Reneker DH, Chun L: Nanometre diameters of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996; 7: 216-223.
 19. Meng ZX, Zeng W, Li L, Zheng YF: Fabrication, characterisation and in vitro drug release behaviour of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. *Materials Chemistry and Physics* 2011; 125: 606-611.
 20. Pham QP, Sharma U, Mikos AG: Electrospun poly (ϵ -caprolactone) microfiber and multilayer nonofiber/microfiber scaffolds: characterisation of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* 2006; 7: 2796-2805.
 21. Sangsanoh P, Suwantong O, Neamnark A, Cheepsunthorn P, Pavasant P, Supaphol P: In vitro biocompatibility of electrospun and solvent-cast chitosan substrata towards Schwann, osteoblast, keratinocyte and fibroblast cells. *European Polymer Journal* 2010; 46: 428-440.
 22. Rho K, Jeong L, Lee G, Seo B, Park Y, Hong S, et al: Electrospinning of collagen nanofibers: effects on behaviour of normal human keratinocytes and early stage wound healing. *Biomaterials* 2006; 27: 1452-1461.
 23. Shangyun L, Wenjuan G, Gu GY: Construction, application and biosafety of silver nanocrystalline chitosan wound dressing. *Burns* 2008; 34: 623-628.
 24. Thakur RA, Florek CA, Kohn J, Michniak BB: Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 364: 87-93.

25. Chen P, Chang Y, Chen K: Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Physicochem. Eng. Aspects* 2008; 313-314: 183–188.
26. Zeng J, Chen X, Liang Q, Bian X: Biodegradable electrospun fibres for drug delivery. *J Control Release* 2003, 92: 227-231.
27. Ji W, Sun Y, Yang F, Beucken JJ, Fan M, Chen Z, Jansen JA: Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharm Res* 2011; 28: 1259-1272.
28. Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tamura H: Novel chitin and chitosan nanofibres in biomedical applications. *Biotechnology Advances* 2010; 28:142-150.
29. Taepaiboon P, Rungsardthong, Supaphol P: Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology* 2006; 17: 2317-2329.
30. Megelski S, Stephens JS, Chase DB, Rabolt JF: Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibres. *Macromolecules* 2002; 35 (22): 8456-8466.
31. Geng X, Kwon OH, Jang J: Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 2005; 26:5427-5432.
32. Li WJ, Danielson KG, Alexander PG, Tuan PS: Biological response of chondrocytes culture in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67:1105-1114.
33. Liu Y, Ji Y, Ghosh K, Clark RA, Huang L, Rafailovich MH: Effect of fiber orientation and diameter on behaviour of human dermal fibroblasts on electrospun PMMA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2009; 90:1092-1106.
34. Pelipelinko J: Izdelava trdnih lipidnih nanodelcev z resveratrolom za terapijo revmatoidnega artritisa. *Diplomska naloga* 2010
35. Slovenski medicinski e-slovar
36. Zhou Y, Yang D, Chen X, Xu Q, Lu F, Nie J. Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. *Biomacromolecules* 2008; 9: 349-354.