

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA VIDIC

**VGRAJEVANJE UČINKOVINE V NANOVLAKNA IZ
POLIVINILNEGA ALKOHOLA Z ELKTROSTATSKIM SUKANJEM**

**INCORPORATION OF THE DRUG INTO POLY (VINYL ALCOHOL)
NANOFIBERS BY ELECTROSPINNING**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl, mag. farm.

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Julijani Kristl, mag. farm. in delovni mentorici Romani Rošic, mag. farm. za strokovno pomoč, potrpežljivost, dosegljivost in razumevanje pri izvedbi diplomske naloge. Posebna zahvala gre doc.dr. Petri Kocbek, mag. farm. za izvedbo posnetkov SEM vseh vzorcev nanovlaken.

Za koristne nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, še posebej Janu Pelipenku, mag. farm. in Tatjani Hrovatič, ing. kem. teh.

Nenazadnje pa se zahvaljujem tudi svoji družini, prijateljem in partnerju, ki so vedno verjeli vame in me spodbujali na vsakem koraku.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Julijane Kristl, mag. farm.

Tina Vidic

Diplomska komisija:

Predsednik:izr. prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Član: doc. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK	IV
KAZALO TABEL	VII
POVZETEK	VIII
ABSTRACT	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XII
1 UVOD	1
1.1 NANOVLAKNA	1
1.1.1 Nanovlakna kot dostavni sistemi	2
1.1.2 Nanovlakna v tkivnem inženirstvu	3
1.1.3 Nanovlakna kot sodobne obloge za celjenje ran	4
1.2 ELEKTROSTATSKO SUKANJE	4
1.2.1 Naprava za elektrostatsko sukanje	4
1.2.2 Mehanizem elektrostatskega sukanja	6
1.2.3 Spremenljivke elektrostatskega sukanja	6
1.2.3.1 Spremenljivke v tehnološkem postopku	7
1.2.3.2 Lastnosti raztopine polimera	8
1.2.3.3 Vpliv okolja	10
1.3 POLIVINILALKOHOL	12
1.4 LEVOFLOKSACIN	13
1.5 BIOLOŠKI ODZIV KERATINOCITOV NA PODLAGO IZ NANOVLAKEN IN VITRO	14
2 NAMEN DELA	15
3 EKSPERIMENTALNO DELO	17
3.1 IZDELAVA NANOVLAKEN	17
3.1.1 Materiali	17
3.1.2 Naprave	18
3.1.3 Postopki in metode	19

3.1.3.1	Priprava raztopin iz polivinilalkohola	19
3.1.3.2	Vrednotenje spremenljivk raztopin polimera	20
3.1.3.3	Izdelava in stabilizacija nanovlaken	21
3.1.3.4	Vrednotenje izdelanih nanovlaken	23
3.1.3.5	Sproščanje zdravilne učinkovine levofloksacina iz izdelanih nanovlaken	24
3.2	BIOLOŠKI ODZIV KERATINOCITOV NA PODLAGO IZ NANOVLAKEN <i>IN VITRO</i>	28
3.2.1	Materiali	28
3.2.2	Naprave	29
3.2.3	Postopki in metode	29
3.2.3.1	Gojenje in presajanje celic	29
3.2.3.2	Priprava nanovlaken za njihovo biološko vrednotenje <i>in vitro</i>	30
3.2.3.3	Vrednotenje vpliva nanovlaken na keratinocite	30
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	LASTNOSTI RAZTOPIN POLIMERA	32
4.1.1	Viskoznost	32
4.1.2	Prevodnost	34
4.2	VREDNOTENJE POGOJEV ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA	36
4.3	VREDNOTENJE IZDELANIH NANOVLAKEN	38
4.3.1	Vpliv koncentracije polivinilalkohola na povprečni premer nanovlaken	39
4.3.2	Vpliv vgrajenega levofloksacina na povprečni premer nanovlaken	39
4.3.3	Vpliv vgrajenega levofloksacina na morfologijo nanovlaken	40
4.3.4	Vpliv stabilizacije na povprečni premer in morfologijo izdelanih nanovlaken	44
4.3.4.1	Vpliv stabilizacije na premer izdelanih nanovlaken	45
4.3.4.2	Vpliv stabilizacije na morfologijo izdelanih nanovlaken	46
4.4	HIDRATACIJA IN EROZIJA IZDELANIH NANOVLAKEN	49
4.4.1	Vpliv hidratacije in erozije na morfologijo izdelanih nanovlaken	52
4.4.2	Vpliv hidratacije in erozije na povprečni premer izdelanih nanovlaken	53
4.5	SPROŠČANJE LEVOFLOKSACINA IZ NANOVLAKEN	54
4.5.1	Vrednotenje čistote in stabilnosti levofloksacina	54
4.5.2	Sproščanje levofloksacina iz izdelanih nanovlaken	57
4.5.2.1	Sproščanje levofloksacina iz nanovlaken stabiliziranih z metanolom	57
4.5.2.2	Sproščanje levofloksacina iz toplotno stabiliziranih nanovlaken	58
4.6	BIOLOŠKI ODZIV KERATINOCITOV NA PODLAGO IZ NANOVLAKEN <i>IN VITRO</i>	60

5	<i>SKLEP</i>	62
6	<i>LITERATURA</i>	64

KAZALO SLIK

Slika 1: Številne možnosti uporabe nanovlaken.	2
Slika 2: Prikaz tipične naprave za elektrostatsko sukanje (ES), s horizontalno postavitvijo brizge. A: Brizga z raztopino polimera; B: igla s premeri od 0,05 do 1,8 mm; C: črpalka, D: izvor visoke napetosti; E: zbiralo.	5
Slika 3: Vpliv električne napetosti na obliko kapljice polimerne raztopine.	7
Slika 4: Strukturna formula polivinilalkohola (PVA).	12
Slika 5: Strukturna formula levofoksacina (L).	14
Slika 6: Izgled raztopin PVA brez in z L.	20
Slika 7: Reometer Physica MCR 301 s senzorskim sistemom stožec-plošča.	21
Slika 8: Merjenje prevodnosti raztopine polimera.	21
Slika 9: Prikaz izdelanih NV iz PVA na zbiralu.	22
Slika 10: Prikaz vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM).	23
Slika 11: NV na krovnem stekelcu, potopljena v fosfatni pufer s pH= 7, 4 med izvedbo postopka za določanje njihove hidratacije in erozije.	24
Slika 12: Umeritvena premica: odvisnost površin kromatografskih vrhov od koncentracije raztopine L v fosfatnem pufru s pH 7, 4. V zgornjem okvirčku je enačba premice, kjer y predstavlja površino pod kromatografskimi vrhovi, x pa koncentracijo L.	26
Slika 13: Shematski prikaz eksperimentalnega modela za ugotavljanje obsega sproščanja L iz NV.	27
Slika 14: Vpliv koncentracije PVA in L na viskoznost raztopin; vsebnost L je v vseh primerih 10 %, glede na vsebnost PVA.	33
Slika 15: Vpliv koncentracije PVA in L na prevodnost raztopin; vsebnost L je v vseh primerih 10 %, glede na vsebnost PVA.	35
Slika 16: Posnetki SEM NV izdelanih iz 8, 9 in 10 % raztopin PVA pri 15 kV ter iz 10 % raztopine PVA pri 25 kV; povečava: 5. 000 x.	38
Slika 17: Vpliv koncentracije raztopine polimera in vpliv vgrajenega L na povprečni premer izdelanih NV; vsebnost L je v vseh primerih 10 %, glede na vsebnost PVA.	39
Slika 18: Posnetki SEM NV izdelanih iz 8 do 12 % polimernih raztopin PVA, brez in z vsebnostjo L; povečava: 20. 000 x.	42

Slika 19: Posnetki SEM NV izdelanih iz različno koncentriranih raztopin PVA z dodatkom L; povečava: 50. 000 x. Na površini NV so vidni kristali L.	43
Slika 20: Velikost kristalov L, ki se pojavljajo na površini NV in povprečni premeri NV v odvisnosti od koncentracije raztopine PVA z dodanim L. Vsebnost L je v vseh primerih 10%, glede na vsebnost PVA.	44
Slika 21: Sprememba povprečnih premerov NV glede na vrsto stabilizacije in glede na koncentracijo PVA v raztopinah iz katerih so bila NV izdelana. Vsebnost L je v vseh primerih 10 %, glede na vsebnost PVA.....	46
Slika 22: Posnetki SEM NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA. Nestabilizirana NV in izpostavljena različnim načinom stabilizacije; povečava: 20. 000 x.....	47
Slika 23: Posnetki SEM NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA z vgrajenim L. Nestabilizirana NV in izpostavljena različnim načinom stabilizacije; povečava: 50. 000 x.	48
Slika 24: Sprememba mase NV stabiliziranih z MeOH, v odvisnosti od časa, v poskusih spreminjanja njihove hidratacije in erozije v fosfatnem pufru s pH 7, 4.....	51
Slika 25: Sprememba mase NV stabiliziranih z EtOH, v odvisnosti od časa, pri poskusih spremljanja hidratacije in erozije v fosfatnem pufru s pH 7, 4.....	51
Slika 26: Sprememba mase toplotno stabiliziranih NV, v odvisnosti od časa, pri poskusih spremljanja hidratacije in erozije v fosfatnem pufru s pH 7, 4.....	51
Slika 27: Posnetki SEM NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA: na levi so prikazana NV stabilizirana z vsemi tremi postopki stabilizacije, pred namakanjem v fosfatnem pufru s pH 7, 4, na desni pa po petih dnevih namakanja; povečava: 50. 000 x.....	53
Slika 28: Velikost povprečnih premerov NV izdelanih iz 10 % PVA stabiliziranih z vsemi tremi načini, pred in po 5 dnevem namakanju NV v fosfatnem pufru s pH 7, 4 (n= 50)..	54
Slika 29: Prikaz retencijskih vrhov na kromatogramu HPLC. A: L v fosfatnem pufru s pH 7, 4; B: L v MeOH; C: L v EtOH- pojav dveh kromatografskih vrhov; D: L, ki smo ga predhodno sušili na 160 °C in nato raztopili v topilu acetonitril: voda (40: 60).	56
Slika 30: Sproščanje L iz v MeOH stabiliziranih NV, izdelanih iz 10 % PVA v odvisnosti od časa.	58
Slika 31: Sproščanje L iz toplotno stabiliziranih NV, pripravljenih iz 10 % PVA v odvisnosti od časa.	59
Slika 32: Keratinociti pod fluorescenčnim mikroskopom, potem ko smo jih predhodno inkubirali 24 in 72 h. Na levi je prikazana kontrola, v kateri so keratinociti na golem	

KAZALO TABEL

Tabela I: Vplivi spremenljivk v postopku ES na premer in morfologijo nastalih nanovlaken (3, 4, 7, 9, 12).....	11
Tabela II: Rezultati meritev viskoznosti vseh PVA raztopin brez in z L.	32
Tabela III: Rezultati meritev prevodnosti vseh uporabljeni raztopin PVA brez in z L.....	34
Tabela IV: Hitrosti pretoka raztopin PVA skozi iglo med procesom ES brez in z dodanim L.....	36
Tabela V: Meritve absorbanca L v fosfatnem pufri, 2 uri po pripravi raztopine, po enem in po petih dnevih.	55

POVZETEK

Nanovlakna (NV) zaradi velikosti premera na nanometrskem nivoju v primerjavi z materiali večjih dimenzij izkazujejo signifikanto spremenjene in edinstvene fizikalne, kemijske ter biološke lastnosti. Prav zaradi tega so NV predmet intenzivnih raziskav v zadnjem desetletju in imajo velik potencial glede uporabe na številnih področjih, še zlasti v biomedicini, kot sodobne obloge za celjenje ran, dostavni sistemi zdravilnih učinkovin ter tkivni nadomestki. Vsestranska, sodobna, enostopenjska in ekonomično učinkovita metoda za izdelavo NV iz različnih polimerov je elektrostatsko sukanje (ES).

V diplomski nalogi so bila izdelana NV iz polivinilalkohola (PVA), v katera smo vgradili 10 % zdravilne učinkovine levofloksacin (L), glede na maso polimera. NV smo pripravili iz petih različnih koncentracij polimera (8 do 12 %), brez in z L, z metodo ES, pri predhodno izbranih najboljših procesnih pogojih. Polimernim raztopinam smo določili viskoznost in prevodnost, dobljenim NV pa premer in morfologijo. Ker so bila PVA NV v fosfatnem pufru obstojna le nekaj sekund, smo jih stabilizirali tako, da smo jih 24 h namakali v metanolu ali etanolu, ali pa 10 min segrevali pri 160 °C, nato pa preučili vpliv teh pogojev na premer in morfologijo NV, z ali brez vgrajene zdravilne učinkovine. Preučevali smo tudi njihovo hidratacijo in erozijo, na najboljših NV z vgrajenim L (10 % PVA) pa smo nato spremljali še sproščanje. Na koncu smo na NV z isto koncentracijo, vendar brez vsebnosti učinkovine L, ovrednotili še rast celične linije keratinocitov *in vitro*. Pri tem smo s pomočjo invertne svetlobne in fluorescenčne mikroskopije opazovali morfologijo in rast celic.

Ugotovili smo, da viskoznost in prevodnost raztopin PVA s koncentracijo in po dodatku L naraščata. Vsa izdelana NV so bila gladka, okrogla in brez vozlov. Rahel pojav vozlov smo opazili le pri NV z vgrajenim L, izdelanih iz 8 in 9 % polimerne raztopine PVA. Premer NV z in brez L se je večal s koncentracijo PVA, kar je sovpadalo z večanjem viskoznosti bolj koncentriranih raztopin in padel po dodatku L, zaradi višje prevodnosti raztopin, ki so vsebovale to učinkovino. Ugotovili smo, da vsi trije uporabljeni fizikalni načini stabilizacije ohranijo fibrilarno zgradbo NV tudi po petih dnevih v fosfatnem pufru, najmanj pa se ta spremeni po toplotni stabilizaciji. Z metodo HPLC smo dokazali čistost in stabilnost L tako pri povišani temperaturi kot tudi v fosfatnem pufru in metanolu ter njegov razpad v etanolu. Ugotovili smo tudi, da je učinkovitost vgradnje L v NV nizka in sicer 4 ± 2 mg/g PVA, na površini NV smo pogosto opazili tudi kristale učinkovine. Iz profilov

sproščanja smo ugotovili, da se L hitro sprosti iz NV. Tako je sproščanje L iz NV stabiliziranih v metanolu potekalo 6 ur, iz toplotno stabiliziranih NV pa le 90 min, pri čemer je glavni razlog za tako veliko razliko prisotnost velikega deleža L na površini toplotno stabiliziranih NV. V sklopu opazovanja rasti keratinocitov *in vitro* na podlagi iz NV smo ugotovili, da le ta močno vpliva na celično obnašanje, kar se kaže v spremenjeni obliki celic.

Dobljeni pozitivni rezultati so osnova za nadaljnji razvoj PVA NV, ki se bodo lahko uporabljala kot osnova za načrtovanje oblog za celjenje kroničnih ran.

ABSTRACT

Nanofibers compared to other higher dimension materials show significant and unique physical, chemical and biological features due to their nanometer size. Therefore, nanofibers are the object of intensive research in the last decade and show great potential in different areas, especially in biomedicine, where they are used as modern wound dressings, drug delivery systems and tissue scaffolds. Universal, modern, one-step and economically efficient method for producing nanofibers from different polymers is electrospinning.

In thesis poly(vinyl alcohol) (PVA) nanofibers with incorporated drug, levofloxacin (L) (10 % m/m) were produced. PVA nanofibers were prepared by electrospinning from five different polymer concentrations (from 8 % to 12 %), with or without the drug, whereas optimal process parameters were preliminary chosen. For all polymeric solutions viscosity and conductivity were determined and for electrospun nanofibers morphology and diameter. Due to instability of nanofibers in phosphate buffer, they were stabilized for 24 hours in methanol and ethanol and for 10 min by 160 °C. Afterwards the influence of stabilization on morphology and diameter of nanofibers without and with incorporated L were evaluated. The study of hydration and erosion of the stabilized nanofibers followed and on the best examples of the nanofibers (10 % of PVA), the release of incorporated drug was observed. Finally, cellular growth of keratinocytes on nanofibers without drug (10 % of PVA) was assessed *in vitro* study, with the help of invert light and fluorescent microscopy.

Our results show that the viscosity and conductivity of the PVA solutions increased with polymer concentration and addition of L. Obtained nanofibers were smooth, round and without beads. Slight occurrence of beads was observed only with the nanofibers made of 8 % and 9 % PVA polymeric solution. Diameter of nanofibers without and with L increased with the concentration of the solution, due to higher viscosity of more concentrated solutions and decreased after L addition, due to higher conductivity of PVA solutions without L. We found out that all the three ways of physical stabilization preserve the fibrillar structure of the nanofibers, even after five-day in the phosphate buffer. Although the smallest change in fibrillar structure was the stabilization at high temperature. With HPLC method we proved the purity and stability of L at high

temperature, in phosphate buffer and methanol and degradation in ethanol. We found out that the efficiency of the incorporated drug is low (4 ± 2 mg/g PVA) and often L was preserved on the surface of some nanofibres. The release profiles showed a fast increase of the initial concentration. The release of L from the nanofibers stabilized in methanol was 6 hours, while the release of nanofibres stabilized with heat was 90 minutes. The main reason for such differences was the presence of a great part of L on the surface, when the nanofibers were stabilized with heat. In the last part, the study of cellular growth of keratinocytes on nanofibers *in vitro*, we found out that nanofibers have strong influence on the behaviour of the cultured cells, since keratinocytes had modified form.

We can conclude that positive results are the basis for further research of PVA nanofibers, which could express great potential as a modern dressing for wound healing.

SEZNAM OKRAJŠAV

ES- elektrostatsko sukanje

EtOH- etanol

HPLC- High Performance Liquid Chromatography- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

L- levofloksacin

MeOH- metanol

NV- nanovlakna

NV- PVA- L- nanovlakna iz polivinilalkohola, ki imajo vgrajeno zdravilno učinkovino levofloksacin

NV- PVA- nanovlakna iz polivinilalkohola

PVA- polivinilalkohol

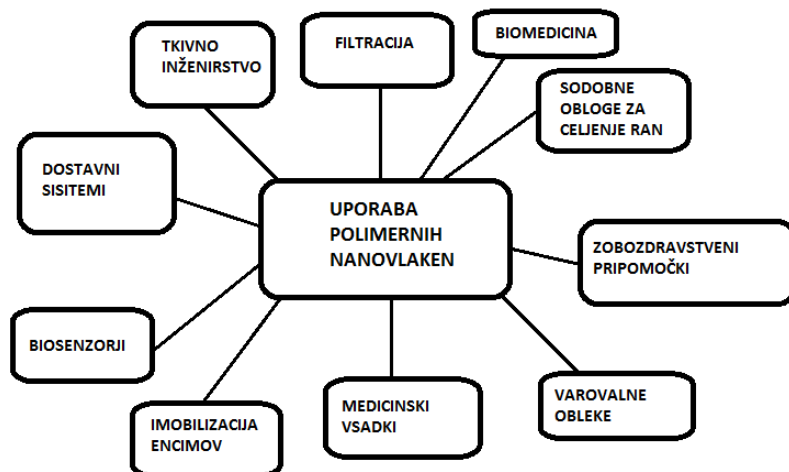
SEM- vrstična elektronska mikroskopija

1 UVOD

Nanotehnologija označuje multidisciplinarni pristop k načrtovanju, izdelavi, karakterizaciji in uporabi sistemov, ki imajo vsaj eno dimenzijo v nanometrskem območju (velikostni razred 10^{-9} m). Takšni materiali izkazujejo velik potencial tudi v farmacevtski znanosti, saj imajo kot nosilni sistemi učinkovin zaradi zmanjšane velikosti signifikantno spremenjene fizikalne, kemijske in biološke lastnosti ter izkazujejo nove fenomene. Med takšne nove nosilce spadajo tudi nanovlakna (NV).

1.1 NANOVLAJNA

NV so najsodobnejša oblika nanomaterialov, ki jih v zadnjem desetletju intenzivno proučujejo. So izredno drobna trdna vlakna z nanometrskim premerom, izdelana iz najrazličnejših polimerov s teoretično neomejeno dolžino, veliko površino na enoto mase in visoko poroznostjo. Dodatno jih odlikuje tudi večja prožnost in mehanska trdnost v primerjavi s katerokoli obliko enakega materiala (1, 2, 3, 4, 5). Zaradi teh edinstvenih lastnosti lahko NV učinkovito uporabljamo na področju medicine, farmacije, filtracije, zaščitnih tkanin, senzorjev, itn (slika 1). Če se osredotočimo na področje biomedicine pa NV raziskujejo za razvoj dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin, sodobnih oblog za celjenje ran ter tkivnih nadomestkov (1, 2, 6).



Slika 1: Številne možnosti uporabe nanovlaken.

1.1.1 Nanovlakna kot dostavni sistemi

Sodobni dostavni sistemi izboljšajo terapevtsko učinkovitost in zmanjšajo toksičnost učinkovine zaradi kontroliranega sproščanja (3, 7). Zaželeno je, da nosilni sistem dostavi učinkovino na določeno mesto aplikacije ter jo sprošča na osnovi ponovljive in znane kinetike sproščanja. V farmaciji v ta namen izberemo biorazgradljive materiale, pri katerih sproščanje učinkovine določata tako difuzija zdravilne učinkovine iz nosilnega sistema kot tudi razgradnja slednjega (3, 8).

Polimerna NV veliko obetajo kot dostavni sistemi s takojšnjim in prirejenim sproščanjem. Običajni polimerni dostavni sistemi nano- in mikrodenci, liposomi in hidrogeli pogosto izkazujejo neželene lastnosti, kot sta t.i. »burst« efekt (hiter začetni porast koncentracije učinkovine) ter nizko učinkovitost vgradnje. Temu fenomenu se lahko izognemo z optimizirano formulacijo NV, s povečanjem specifične površine in uporabo učinkovin v amorfnih oblikah pa povečamo tudi hitrost njihovega raztapljanja (1, 2, 8).

Glede na strukturo NV z vgrajeno učinkovino, jih lahko razdelimo na več tipov, in sicer: (i) polimerna NV z adsorbirano učinkovino, (ii) polimerna NV z učinkovino vgrajeno v njihovo notranjost, (iii) preplet dvojnih različnih NV, pri čemer so ena pripravljena iz učinkovine, druga pa iz polimerne raztopine, ter (iv) NV tipa jedro- ovojnica, pripravljena s koncentrično šobo (6, 9). Raziskovalci so v NV uspeli vgraditi že različne učinkovine, kot so antibiotiki, antimikotiki, protitumorske učinkovine, polisaharide, proteine in rastne

dejavnike (3, 8). Najpogosteje vgradijo učinkovino v notranjost NV, in sicer tako, da jo raztopijo v polimerni raztopini, nato pa pripravijo NV z elektrostatskim sukanjem (ES) (6). Taepaiboon in sodelavci so preučevali transdermalne dostavne sisteme pripravljene s postopkom ES iz NV iz polivinilalkohola (PVA), v katera so vgradili štiri različne nesteroidne protivnetne učinkovine z različno topnostjo: salicilno kislino, diklofenak, naproksen in indometacin. Z metodo H-NMR so dokazali, da postopek ES ne poruši kemijske celovitosti vgrajenih učinkovin, da prisotnost zdravilne učinkovine vpliva na razgradnjo NV ter da sta hitrost in količina sproščene učinkovine obratno sorazmerni z molekulsko maso. Tako pripravljena NV so primerjali s filmi PVA, v katera so vgradili iste zdravilne učinkovine ter ugotovili, da imajo v primerjavi z njimi NV zaradi boljše poroznosti večjo stopnjo nabrekanja in izgubo mase ter boljše lastnosti sproščanja učinkovine (7).

1.1.2 Nanovlakna v tkivnem inženirstvu

Tkivno inženirstvo je hitro razvijajoče se interdisciplinarno področje, katerega cilj je razvoj tkivnih nadomestkov z biološkimi in inženirskimi procesi, namenjeni obnavljanju, vzdrževanju ali izboljšanju funkcij tkiv (1, 2). Natančnejše biološko poznavanje strukture človeških tkiv razkrije, da je večina tkiv in organov na nanometrskem nivoju hierarhično urejena v obliki vlaknaste strukture, zato lahko hitro vidimo potencial NV na področju tkivnega inženirstva. Raziskave so celo pokazale, da že sama topografija NV ne glede na material, iz katerega so izdelana, ugodno vpliva na celično obnašanje, saj vzpodbuja celične procese (1, 10, 11).

NV raziskujejo kot nadomestke za krvne žile, kosti, hrustanec, vezi, srce, živce, itn, z metodo ES pa jih lahko pripravimo tako iz naravnih polimerov, na primer hitosana, alginata, želatine, fibrina, kolagena, hialuronske kisline, keratina, elastina, kot tudi iz sinteznih polimerov, na primer PVA, polietilenoksida (PEO), polimlečne (PLA) ter poliglikolne kisline (PGA). Tudi na tem področju so primarna izbira biorazgradljivi materiali, saj v tem primeru za odstranitev tkivnega nadomestka ni potreben sekundarni kirurški poseg. Vsi uporabljeni materiali za tkivne nadomestke pa morajo seveda biti biokompatibilni (1, 11).

1.1.3 Nanovlakna kot sodobne obloge za celjenje ran

Potrebe po sodobnih oblogah za pospešeno celjenje ran postajajo iz dneva v dan večje, saj je vsako leto večje število ran, ki jih je treba oskrbeti (1). Danes zdravljenje ne temelji več na uporabi klasične gaze, ki rano izsuši, temveč na uporabi sodobnih oblog, ki omogočajo vlažno mikrookolje na rani, s tem pa hitrejšo in popolnejšo celjenje (1, 11).

NV zaradi svoje strukture pravzaprav predstavljajo idealne obloge za rane. Imajo namreč ravno pravšnjo velikost in število por, da omogočajo veliko prepustnost za pline, obenem pa ščitijo rano pred vdorom bakterij ter se na rano dobro prilegajo. Poleg tega preprečijo njeno dehidracijo in s tem ustvarjajo vlažno okolje, povečajo stopnjo epitelizacije, usnjica pa se v NV dobro organizira in predstavlja dodatno oporo za nadaljnjo epitelizacijo vrhnjice. Poleg tega lahko v NV vgradimo različne zdravilne učinkovine potrebne za celjenje ran (antibiotiki, rastni dejavniki, itn.). Poglavitna prednost tovrstnih oblog je ta, da posnemajo naravni zunajcelični matriks, katerega proizvodnja je v kroničnih ranah okrnjena, s tem pa spodbujajo celične aktivnosti in omogočijo zaprtje rane (1).

1.2 ELEKTROSTATSKO SUKANJE

Elektrostatsko sukanje (ES) (*ang. electrospinning*) je metoda za izdelavo NV iz raztopin ali talin najrazličnejših polimerov, ki temelji na uporabi visoke električne napetosti (12, 13). Postopek je sicer znan že več kot sto let, vendar pa je na raziskovalnem in industrijskem področju postal izjemno zanimiv v zadnjem desetletju, saj omogoča cenovno ugodno, enostavno in vsestransko izdelavo vlaken tako na nano- kot tudi mikrometrskem nivoju (3, 5, 12, 13).

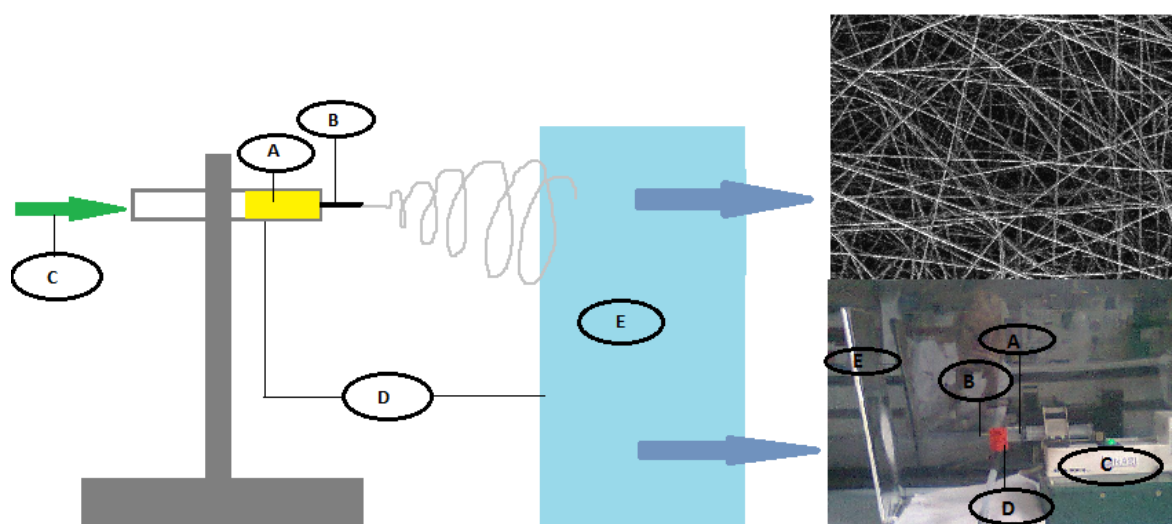
1.2.1 Naprava za elektrostatsko sukanje

Običajna naprava za ES je sestavljena iz treh delov (Slika 2):

- generatorja, ki omogoča visoko napetost,
- brizge s kovinsko iglo majhnega premera, med 0,05 in 1,8 mm, skozi katero apliciramo polimerno raztopino, ter
- zbirala, kjer se zberejo nastala NV (3, 4, 12).

Ker je izvor visoke napetosti pritrjen na kovinsko iglo, zbiralo pa je najpogosteje ozemljeno, se med konico igle in zbiralom ustvari električno polje, ki je potrebno za izdelavo NV (3, 6). Brizga je lahko nameščena bodisi navpično glede na zbiralo pod njo, pri čemer pretok raztopine skozi iglo zagotavlja gravitacijska sila, bodisi horizontalno, kjer pa je potrebno za zagotavljanje pretoka uporabiti črpalko (3, 4).

Osnovna naprava za ES omogoča izdelavo NV iz enega polimera v primernem topilu, medtem ko so za izdelavo zahtevnejših NV raziskovalci razvili različne modifikacije in izboljšave na šobi ter na zbiralu osnovne naprave. Danes so na voljo naprave, ki imajo nameščenih več igel na eni brizgi, ki omogočajo izdelavo večje količine NV. Aparat s šobo z dvema vzporedno postavljenima igloma pa je primeren za izdelavo NV iz dveh različnih polimerov, ki nista topna v istem topilu (3). Največ zanimanja je v zadnjem času za koaksialno šobo, v kateri sta igli nameščeni koncentrično (igla z manjšim premerom je znotraj igle z večjim), ki omogoča izdelavo NV tipa jedro- ovojnica (3, 9). Takšna struktura NV namreč omogoča večji nadzor sproščanja vgrajenih učinkovin, poleg tega pa lahko na tak način nanj vgradimo tudi proteinske učinkovine brez nevarnosti za porušenje njihove nativne strukture. Zbirala, ki jih uporabljamo v procesu ES, pa vplivajo na urejenost pridobljenih NV. Najpogosteje se uporablja planarna aluminijeva folija, na kateri se vlakna orientirajo naključno. Nastanek usmerjenih NV pa omogočata uporaba rotirajočih zbiral ter ločenih elektrod (3, 6, 12, 14, 15).



Slika 2: Prikaz tipične naprave za elektrostatsko sukanje (ES), s horizontalno postavitvijo brizge. A: Brizga z raztopino polimera; B: igla s premeri od 0,05 do 1,8 mm; C: črpalka, D: izvor visoke napetosti; E: zbiralo.

1.2.2 Mehanizem elektrostatskega sukanja

Osnovni princip izdelave NV z ES temelji na uporabi elektrostatske sile (6, 7, 12). Generator ustvari visoko napetost, ki povzroči tvorbo električno nabitega curka polimerne raztopine ob izhodu iz igle. Curek nato potuje skozi zrak, pri čemer topilo odhlapi, trdna NV pa se zberejo na zbiralu (6, 12).

Raztopina polimera sprva le kaplja skozi iglo, ob priključitvi visoke napetosti pa se vanjo uvaja električni naboj, ki se porazdeli po površini kapljice. Z višanjem napetosti zaradi naraščajočih odbojnih sil med istovrstnimi naboji v raztopini in privlačnimi silami med raztopino in nasprotno nabitim zbiralom, povzroči podaljševanje viseče kapljice na koncu kapilarne igle. Nato se doseže točka, v kateri so elektrostatske sile v ravnovesju s silo površinske napetosti raztopine, kar vodi v nastanek Taylor-jevega stožca. Z nadaljnjim povečevanjem električne napetosti se iz Taylor-jevega stožca tvori nabit curek, ki potuje do ozemljenega ali nasprotno nabitega zbirala (3, 4, 5, 6, 12). Na tej poti na curek deluje več različnih sil: gravitacijska; elektrostatska sila, ki vleče curek do zbirala; elektrostatska odbojna sila, ki predstavlja odboj med enako nabitimi delci; viskoelastična sila in površinska napetost, ki preprečujeta raztegnitev curka ter vlečna sila, ki nastane zaradi upora med curkom in okoliškim zrakom (3). Posledica delovanja vseh teh sil je tanjšanje in raztegovanje curka do nanometrskih velikosti. Velikokrat pa pride pri tem tudi do zvijanja, razprševanja in spremembe poti curka. Med potovanjem curka do zbirala topilo izhlapeva, zato se na zbiralu zberejo trdna NV (3, 14, 15, 16). Poenostavljeno bi lahko rekli, da gre pri ES za raztegovanje polimernih verig. Velja pa poudariti, da je opisani mehanizem le ena od možnih razlag molekularnega dogajanja med tvorbo NV, saj je razumevanje celotnega procesa še vedno zelo omejeno (6, 13).

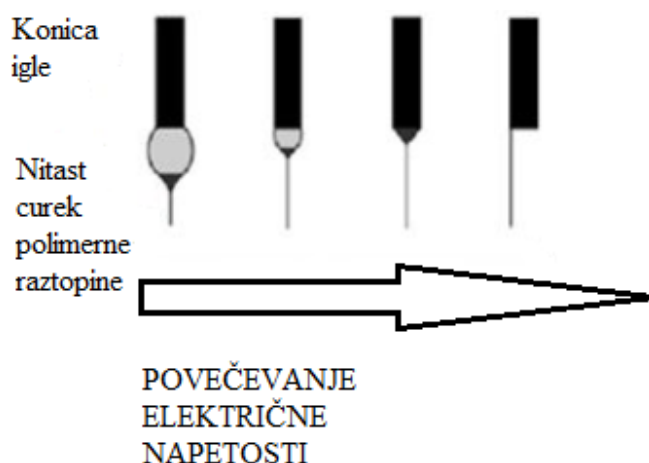
1.2.3 Spremenljivke elektrostatskega sukanja

Na tvorbo in strukturo izdelanih NV močno vplivajo spremenljivke znotraj tehnološkega postopka (napetost električnega polja, pretok skozi iglo, razdalja od konice igle do zbirala), lastnosti polimerne raztopine (koncentracija, viskoznost, prevodnost, molekulska masa, površinska napetost) in vpliv okolja (temperatura, relativna vlažnost) (3, 4, 6, 7, 9).

1.2.3.1 Spremenljivke v tehnološkem postopku

Napetost električnega polja je najpomembnejša spremenljivka tehnološkega postopka. Dovolj visoka električna napetost namreč vnese v raztopino polimera naboj, ki omogoči oblikovanje curka in njegovo potovanje skozi električno polje do zbirala (3). Rezultati preučevanja vpliva električne napetosti na premer NV pa niso enotni. Remker in Chun sta na primeru NV iz PEO dokazala, da električna napetost ne vpliva na njihov premer. Drugi raziskovalci so mnenja, da večja električna napetost poveča masni pretok polimerne raztopine skozi iglo, kar posledično povzroči nastanek NV z večjim premerom. Nekateri pa menijo, da večja električna napetost poveča moč električnega polja skozi katerega potuje curek polimerne raztopine, zaradi česar se povečajo odbojne sile v curku, na zbiralu pa nastanejo NV z manjšimi premeri (12).

Napetost električnega polja vpliva tudi na mesto nastanka polimernega curka na konici igle (slika 3), s tem pa posledično tudi na pojavnost vozlov. Pri nizki napetosti se namreč na konici igle ustvari viseča kapljica, na koncu te pa se tvori Taylor-jev stožec, iz katerega izhaja curek polimerne raztopine. Z večanjem električne napetosti se velikost kapljice zmanjšuje, zato se Taylor-jev stožec tvori že na konici igle, kar je najbolj zaželeno in ima za posledico nastanek gladkih nanovlaken. Z nadaljnjim večanjem električne napetosti pa povzročimo, da se curek raztopine tvori neposredno iz igle, kar posledično vodi v nastanek NV z večjim številom vozlov (3).



Slika 3: Vpliv električne napetosti na obliko kapljice polimerne raztopine.

Pretok skozi iglo vpliva na hitrost potovanja polimerne raztopine ter na količino prenesenega materiala (12). Vpliva tudi na premer, poroznost in morfologijo nastalih NV. Pri večjih pretokih nastanejo NV z večjim premerom in večjo velikostjo por. Hkrati pa visoki pretoki raztopine polimera onemogočajo, da topilo popolnoma izhlapi, zato se na zbiralu zbirajo neposušena NV z večjim številom vozlov in madeži polimera. Pri tem pa moramo omeniti, da je za tvorbo Taylor-jevega stožca potreben nek minimalni pretok raztopine polimera (3, 12).

Razdalja od konice igle do zbirala prav tako vpliva na premer in morfologijo NV. Raziskovalci so odkrili, da z daljšanjem razdalje nastanejo NV z manjšim premerom (3). Manjše razdalje omogočajo izdelavo ploščatih, večje pa valjastih NV (12). Seveda je tudi v tem primeru potrebna neka minimalna razdalja ki omogoča odhlapiitev celotnega topila in nastanek suhih NV na zbiralu (12).

1.2.3.2 Lastnosti raztopine polimera

Koncentracija raztopine polimera predstavlja poleg viskoznosti, prevodnosti in površinske napetosti zelo pomemben podatek, ki vpliva na nastanek NV (12). Tako mora imeti raztopina polimera dovolj visoko koncentracijo, da je omogočeno prepletanje polimernih verig, s tem pa stabilizacijo nastalega curka, hkrati pa ta ne sme biti previsoka, saj bi prevelika viskoznost omejila gibanje polimera v električnem polju (3, 4). Prenizke koncentracije raztopine polimera onemogočajo nastanek polimernega curka, saj se ta še preden doseže zbiralo, prekine. Nastanejo kapljice pri čemer na zbiralu dobimo le posušene delce ali NV z veliko vozli (3, 17).

Raziskovalci so ugotovili, da iz bolj koncentriranih raztopin polimerov nastanejo NV z večjim premerom. S povečevanjem koncentracije raztopine polimera pa se postopno spreminja tudi oblika nastalih NV in sicer iz sferične v vretenasto. Pri optimalni koncentraciji raztopine pa dobimo enotno oblikovana NV (4, 12, 17).

Viskoznost, koncentracija in molekulska masa so torej med seboj zelo povezane spremenljivke, ki močno vplivajo na nastanek NV. S povečevanjem koncentracije in molekulske mase polimera se zvišuje tudi viskoznost. Za nastanek gladkih NV je zato

nujno potrebna primerna viskoznost raztopine (12). Raztopino z visoko viskoznostjo je težko potisniti skozi ozko iglo, kar seveda onemogoča pripravo NV s postopkom ES (3). Po drugi strani pa prenizka viskoznost raztopine polimera onemogoča nastanek kontinuiranega nitastega curka, zato se tvorijo NV z veliko vozli (12).

Prevodnost raztopine polimera je pomemben dejavnik priprave NV z ES, saj število nabitih skupin v verigah polimera vpliva na stabilizacijo nastalega curka. Ugotovili so, da se z večanjem prevodnosti zmanjšuje premer nastalih NV (12). Raztopine z večjo prevodnostjo imajo namreč večjo gostoto naboja, ki poveča moč elektrostatskih odbojnih sil, te pa tanjšajo curek na poti k zbiralu. Tovrsten curek je med potovanjem v električnem polju izpostavljen večjim nestabilnostim in nihanju, kar posledično vodi v nastanek NV z različno velikimi premeri (3, 12).

Na prevodnost raztopine lahko vplivamo z izbiro ustreznega polimera in topila, pri čemer pa slabše prevodni polimeri onemogočajo izdelavo NV z ES. Z minimalnim dodatkom soli lahko prevodnost raztopin izboljšamo, kar tudi znatno izboljša izdelavo NV. Tako je Zong s sodelavci preučeval vpliv soli na morfologijo in premer NV izdelanih iz PLA in PLGA ter ugotovil, da po dodatku KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 ali NaCl nastanejo NV s premeri od 200 do 1000 nm brez vozlov. Brez dodatka soli pa so dobili NV z večjim številom vozlov in z neenakomernimi premeri. Pristop povečevanja prevodnosti raztopin polimerov so kasneje preučevali tudi drugi raziskovalci, na primer Zhang in sodelavci na NV iz PVA, in prišli do enakih zaključkov (12).

Površinska napetost je odvisna od sestave topila, v katerem je raztopljen polimer. Splošno velja, da večja površinska napetost raztopine polimera onemogoča proces ES, saj povzroči nestabilnost nitastega curka, nastanek posušenih kapljic in NV z vozli na zbiralu. Ob tem pa je potrebna tudi visoka uporabljena električna napetost, zato delo ni več varno. V splošnem velja, da nižja površinska napetost raztopine polimera omogoča izdelavo NV z manj vozli (12).

1.2.3.3 Vpliv okolja

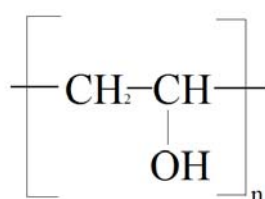
Temperatura in relativna vlažnost sta spremenljivki okolja, ki pomembno vplivata na proces ES, vendar pa sta razmeroma slabo preučevani. Raziskovalci so ugotovili, da temperatura okolja izrazito vpliva na premer nastalih NV. Pri povišani temperaturi namreč zaradi zmanjšanja viskoznosti raztopine nastanejo NV z manjšim premerom. Relativna vlažnost zraka pa vpliva na hitrost izhlapevanja topila. Pri nizki vlažnosti okolja topilo hitreje izhlapi, pri visoki pa se vlakna, ki se odložijo na zbiralu med seboj manj odbijajo in so zato pore med njimi manjše (3, 12).

Tabela I: Vplivi spremenljivk v postopku ES na premer in morfologijo nastalih nanovlaken (3, 4, 7, 9, 12).

PARAMETRI TEHNOLOŠKEGA POSTOPKA		
	VPLIV NA PREMER NASTALIH NV	VPLIV NA MORFOLOGIJO NASTALIH NV
Napetost električnega polja	neenotno mnenje: - nima vpliva - ↑ napetost ⇔ ↑ masni pretok ⇔ ↑ premer NV - ↑ napetost ⇔ ↑ moč el. polja ⇔ ↑ odbojne sile ⇔ ↓ premer NV	↑ el. napetost ⇔ ↑ pojavnost vozlov
Pretok skozi iglo	↑ pretok ⇔ ↑ premer NV	↑ pretok ⇔ ↑ velikost por ⇔ ↑ pojavnost vozlov
Razdalja od konice igle do zbirala	↑ razdalja ⇔ ↓ premer NV	↓ razdalja ⇔ ploščata NV ↑ razdalja ⇔ valjasta NV
LASTNOSTI RAZTOPINE		
Koncentracija polimera	↑ koncentracija ⇔ ↑ premer NV	↓ koncentracija ⇔ ↑ pojavnost vozlov ↑ koncentracije ⇔ sprememba oblike NV iz kroglaste v vretenasto
Viskoznost	↑ viskoznost ⇔ ↑ premer NV	↓ viskoznost ⇔ ↑ pojavnost vozlov
Prevodnost	↑ prevodnosti ⇔ ↓ premer NV	↓ prevodnosti ⇔ ↑ pojavnost vozlov
Površinska napetost	/	↑ površinska napetost ⇔ ↑ pojavnost vozlov (Določa tudi vrednost uporabljene električne napetosti.)
Molekulska masa	↑ molekulska masa ⇔ ↑ premer NV	↓ molekulska masa ⇔ ↑ pojavnost vozlov
VPLIV OKOLJA		
Temperatura	↑ temperatura ⇔ ↓ viskoznost ⇔ ↓ premer NV	↑ temperatura ⇔ ↓ viskoznost ⇔ ↑ pojavnost vozlov
Relativna vlažnost	/	↑ relativna vlažnost ⇔ ↓ naboj na površini NV ⇔ ↓ poroznost nastalih NV

1.3 POLIVINILALKOHOL

Polivinilalkohol (PVA) obstaja v obliki belega do kremno belo obarvanega praška ali granul, brez vonja in okusa (18, 21). Izdelajo ga s popolno ali delno hidrolizo polivinilacetata, njegova tipična molekulska masa pa je od 20 000 do 200 000 kDa. Na tržišču so na voljo različne vrste, ki se med seboj razlikujejo v stopnji polimerizacije in substitucije (18).



Slika 4: Strukturna formula polivinilalkohola (PVA).

PVA je topen v visoko polarnih in hidrofilnih topilih, kot so voda, dimetilsulfoksid, etilenglikol in N- metilpirolidon, v 95 % etanolu je le delno topen, netopen pa v organskih topilih (18).

Voda je eno izmed najpomembnejših topil PVA, s katero lahko tvori intra- ali intermolekularne vodikove vezi. Njegova topnost v vodnih raztopinah je odvisna od stopnje polimerizacije, hidrolize in temperature. PVA z nizko stopnjo polimerizacije in hidrolize je topen v vodi že pri 20 °C, medtem ko je ob naraščanju stopnje polimerizacije in hidrolize za popolno topnost polimera v vodi potrebna temperatura okrog 80 do 90 °C. Topnost PVA z visoko stopnjo polimerizacije in nizko stopnjo hidrolize v vodi pri sobni temperaturi pa hitro pada in polimer začne tvoriti gel (18).

Stabilnost PVA v vodnih raztopinah je sicer nizka, saj pride do geliranja in krčenja raztopine. Zato moramo raztopine stabilizirati, to pa lahko naredimo s cepljenjem, kopolimerizacijo ali premreženjem z različnimi substancami, kot so polivinilpirolidon, natrijev alginat, glutaraldehid ter z namakanjem v metanolu (MeOH) in etanolu (EtOH) (19, 20).

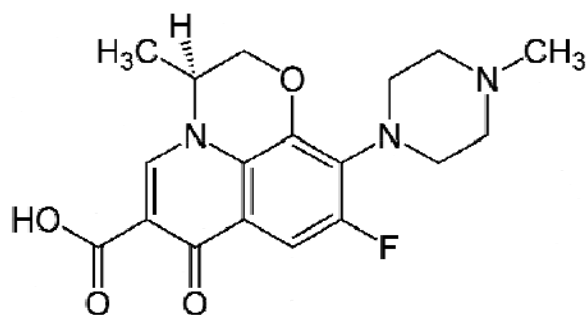
PVA je dobro poznan polimer in eden izmed najbolj uporabljenih sinteznih polimerov na svetu (18). Ima primerne mehanske lastnosti, je kemijsko in temperaturno stabilen, hidrofilen, dobro permeabilen za vodo, biokompatibilen, biorazgradljiv, netoksičen, nekarcinogen in razmeroma poceni (7, 18, 19, 21). Zaradi vseh teh dobrih lastnosti je široko uporaben in sicer tako na področju biomedicine (mehke kontaktne leče, medicinski vsadki, tkivni nadomestki, biosenzorji, itn), farmacije (izdelava NV z ES, dostavni sistemi za zdravilne učinkovine, sodobne obloge za celjenje ran, emulgator in stabilizator za koloidne suspenzije itn.), tekstilne in papirne industrije (18, 19, 20).

PVA pa je tudi eden izmed prvih polimerov za izdelavo NV z ES, ki se še vedno pogosto uporablja. To potrjujejo številne raziskave, ki poročajo o uspešni pripravi NV iz polimernih raztopin PVA ali PVA v kombinaciji z različnimi naravnimi ali sintezniimi polimeri in sicer pod različnimi procesnimi pogoji postopka ES (7, 17, 18, 19, 20).

1.4 LEVOFLOKSACIN

Levofloksacin (L) ali kemijsko (-)- (S)- 9- fluoro- 2, 3- dihidro- 3- metil- 10-(4- metil-1- piperazinil)- 7- okso- 7H- pirido [1, 2, 3- de]- 1, 4- benzoksazin -6- karboksilna kislina (slika 5) je sintezna protibakterijska zdravilna učinkovina tretje generacije iz skupine fluorokinolonov. L je S (-) enantiomer racemne oblike zdravilne učinkovine ofloksacin, ki pa ima od nje dvakrat večjo jakost. Ker R (+) enantiomer ni aktiven je L tudi manj toksičen od ofloksacina. (22, 23).

Levofloksacin deluje na kompleks DNA- giraza DNA in na topoizomerozo IV. Z inhibicijo encima giraze DNA se v bakterijski celici ustavi proces uvajanja dodatnih negativnih zavojev, s tem pa so onemogočeni vitalni biološki procesi, kot sta replikacija in transkripcija. Tako se ustavi sinteza DNA in celična rast bakterije (22, 24):



Slika 5: Strukturna formula levofoksacina (L).

Devi in Chandrasekhar sta preučevala stabilnost L pod različnimi pogoji ter z metodo RP-HPLC ugotovila, da je L stabilen pod vplivom alkalne hidrolize, fotolize in visoke temperature, do manjšega obsega njegove razgradnje pride pod vplivom kisle hidrolize, do večjega pa pod oksidativnim pogojem. Izvedla sta tudi pospešene in dolgoročne teste stabilnosti, da bi preučila vplive okolja med shranjevanjem in po enoletnem testiranju ugotovila, da ni bilo prisotnih nečistoč oziroma da ni prišlo do razgradnje učinkovine (22).

1.5 BIOLOŠKI ODZIV KERATINOCITOV NA PODLAGO IZ NANOVLAKEN *IN VITRO*

Za NV, ki se uporabljajo kot tkivni nadomestki, sodobne obloge za celjenje ran in dostavni sistemi je bistvenega pomena da poznamo njihov vpliv v okolju *in vivo*, kar lahko ovrednotimo s poskusi na nosilnih celicah. Pri tem se spremlja morfolologijo celic, njihovo pritrnitev na podlago oziroma NV, proliferacijo ter gostoto v kulturi, medsebojno ureditev, itn. Raziskovalci so ugotovili, da je za izdelavo dobrega tkivnega nadomestka izredno pomembno, da se celice takoj pritradijo na nosilno ogrodje oziroma se vanj vključijo ter se znotraj njega razmnožujejo. Dokaz za njihovo pritrnitev je razvoj filopodijev oziroma celični izrastkov. Večina raziskovalcev poroča o boljšem pritrjevanju celic na mreže NV, kot pa na ravno površino. Dodatno so ugotovili tudi, da celice pri gojenju v mreži NV pridobijo podolgovato obliko, saj rastejo vzporedno z vlakni ter da nanotopografija NV pomembno vpliva na celično proliferacijo (25).

2 NAMEN DELA

Sodobne obloge za pospešeno celjenje ran postajajo v današnjem času vedno bolj zanimive za raziskovalce, saj je velik izziv razviti takšno farmacevtsko obliko, ki po eni strani omogoča nadzorovano sproščanje zdravilnih učinkovin (antibiotikov, rastnih dejavnikov, itn) na mestu njihovega delovanja, po drugi strani pa zaradi svoje strukture dodatno pripomore k hitrejšemu celjenju rane. Prav v ta namen lahko učinkovito uporabljamo tudi polimerna NV.

Namen diplomske naloge bo s postopkom ES izdelati NV iz raztopin PVA z različnimi koncentracijami. Vanj bomo poskusili vgraditi zdravilno učinkovino, ki pripomore k celjenju ran.

Prvi cilj diplomske naloge bo priprava 8- 12 % raztopine PVA v vodi, in sicer brez in z zdravilno učinkovino L. V vseh raztopinah polimera bomo ovrednotili spremenljivki viskoznost in prevodnost, ki sta pomembni za potek procesa ES, obenem pa preučili še vpliv L na lastnosti raztopin. Na podlagi teh in predhodnih eksperimentalnih rezultatov dobljenih na UL Fakulteti za farmacijo, bomo določili optimalne pogoje postopka ES, kot so električna napetost, razdalja od konice igle do zbirala in pretok raztopine polimera skozi iglo, ki vsi močno vplivajo na morfologijo nastalih NV.

Drugi cilj naloge bo priprava NV s postopkom ES iz desetih različnih raztopin (8, 9, 10, 11, 12 % NV- PVA in NV- PVA- L) in stabilizacija pripravljenih NV, ki v vodnem mediju niso obstojna. Fizikalno stabilizacijo NV bomo izvedli s tremi različnimi metodami, in sicer namakanjem v netopilih MeOH in EtOH, ter pri povišani temperaturi. Sledilo bo morfološko vrednotenje nastalih NV, pred in po stabilizaciji, s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije (SEM) in računalniškega programa ImageJ. Preučevali bomo tudi odvisnosti med premerom NV in koncentracijo, viskoznostjo ter prevodnostjo polimerne raztopine in prisotnostjo L, pri čemer bomo izbrali najboljši način stabilizacije proizvedenih NV.

Tretji cilj diplomske naloge bo preučevanje hidratacije in erozije stabiliziranih NV- PVA v fiziološkem okolju. Na tej stopnji bomo na podlagi dobljenih rezultatov izbrali tisto koncentracijo raztopine polimera, s katero bomo pripravili NV z optimalnimi lastnostmi

(brez vozlov, s primerno morfologijo, itn). Nato jo bomo uporabili za pripravo NV- PVA-L in preučili še sproščanje zdravilne učinkovine v fosfatnem pufru s pH 7, 4. Sproščeno učinkovino L bomo analizirali z metodo HPLC.

Četrty cilj diplomske naloge bo ovrednotenje odziva *in vitro* biološke celične linije keratinocitov na nanotopografijo NV- PVA izdelanih z izbrano koncentracijo raztopine polimera. Debelino in morfologijo NV bomo ugotavljali s pomočjo SEM posnetkov, morfologijo in rast celic pa opazovali z invertno svetlobno in fluorescenčno mikroskopijo.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 IZDELAVA NANOVLAKEN

3.1.1 Materiali

Polimeri, topilo in zdravilna učinkovina za izdelavo NV

- Polivinilalkohol Mowiol ® 20- 98, Mr= 125 000 g/ mol, stopnja hidrolize 98, 0- 98, 8 %, stopnja polimerizacije 2800, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Nemčija;
- Prečiščena voda;
- Levofloksacin, Lek d.d., Ljubljana, Slovenija.

Reagenti za stabilizacijo NV

- Etanol 96% PharmaChem, Ph. Eur. 5. 0, vsebnost etanola 95, 1- 96, 9 % (v/v), Nemčija;
- Metanol analitske kakovosti, Mr: 32, 04 g/ mol Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija.

Reagenti za pripravo fosfatnega pufru s pH 7, 4

- Natrijev klorid (> 99, 5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Kalijev klorid (> 99, 5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Dinatrijev hidrogenfosfat (> 99, 0 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Kalijev dihidrogenfosfat (> 99, 5- 100, 5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Natrijev hidroksid (> 99, 0 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Klorovodikova kislina 37 %, Merck KGaA Darmstadt, Nemčija;
- Prečiščena voda.

Reagenti za pripravo mobilne faze za HPLC analitiko

- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, (98, 0- 100, 5 %) Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Trietilamin (> 99, 5 %), FLUKA, Buchs, Švica;
- Orto-fosforna kislina 85 % , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Dvakrat prečiščena voda.

Reagenti za pripravo topil za analitiko HPLC

- Acetonitril za tekočinsko kromatografijo, (> 99,9 %) Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Metanol za tekočinsko kromatografijo, (> 99,9 %) Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- Dvakrat prečiščen voda.

3.1.2 Naprave

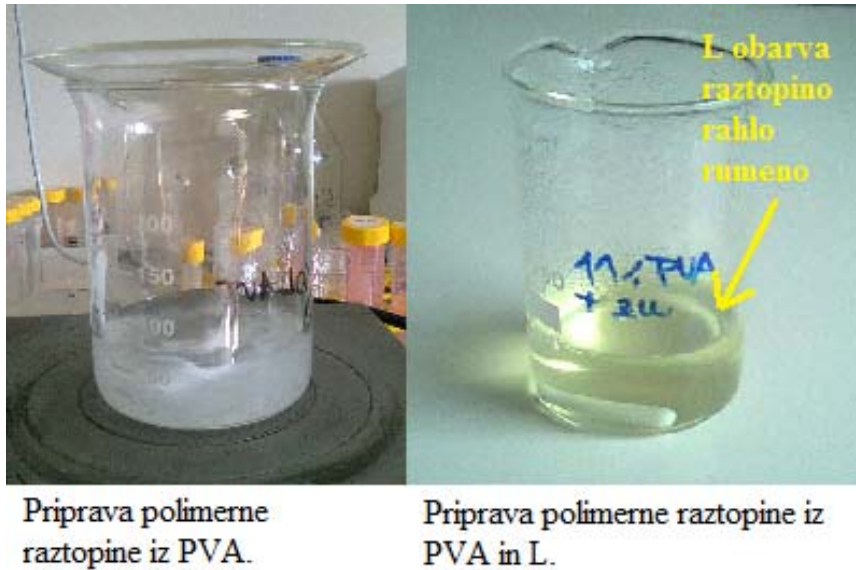
- Aluminijska folija;
- Analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica;
- Analitska tehtnica, Mettler Toledo XS 205, Schwerzenbach, Švica;
- Avtoklav Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija;
- Digitalna tehtnica, Vibra AJ, Tokyo, Japan;
- Kovinska mrežica;
- Magnetno mešalo, IKA® RH basic KT/C, New Jersey, ZDA;
- Magnetno mešalo, Rotamix 550 MMH, Tehnica, Železniki, Slovenija;
- Merjenje prevodnosti: Conductivity meter, Ma 5964, Iskra, Slovenija, konstanta 0,7265 1/cm, osebni računalnik;
- 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, Physica, Stuttgart, Nemčija, osebni računalnik;
- Naprava za elektrostatsko sukanje:
 - 20 mL brizga, B-Braunn, ZDA,
 - kovinska igla z notranjim premerom 0,8 mm, Linari Engineering, Italija,
 - črpalka, Razel TM, Ma R-99E, Italija,
 - generator visoke napetosti, Linari Engineering s.r.l., Ma. P60-R-EU, Italija,
 - aluminijska folija kot planarno zbiralo;
- Obojestranski lepilni prevodni trak, premer 12 mm, Oxon, Oxford instruments, Velika Britanija;

- Plastične petrijevke;
- Pipeta 1000 μ l;
- Računalniški program ImageJ, Image Processing and Analyzing in Java, 1. 44p, NIM, ZDA;
- Sistem za visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC), Agilent Series, Agilent Technologies, Nemčija, kolona Symmetry C 18, 5 μ m, 4'6 x 250 mm, Ireland;
- Spektrofotometer, Agilent 8453, Agilent Technologies, Nemčija;
- Ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija;
- Velika krovna stekelca (22 x 22 mm);
- Vrstični ali 'scanning' elektronski mikroskop (SEM mikroskop) SEM Supra 35 VP, Oberkochen, Zeiss, Nemčija.

3.1.3 Postopki in metode

3.1.3.1 Priprava raztopin iz polivinilalkohola

Za pripravo 8, 9, 10, 11 in 12 % (m/ m) raztopin PVA smo natehtali ustrezno količino polimera v prahu, ga kvantitativno prenesli v stekleno čašo, mu dodali prečiščeno vodo in čašo pokrili z aluminijasto folijo. Nato smo vsebino v čaši 2 do 4 ure, odvisno od koncentracije raztopine, mešali in segrevali na magnetnem mešalu pri približno 90 °C, tako da se je raztopila celotna količina PVA in koščki polimera niso bili več vidni. Raztopine PVA smo nato pri sobni temperaturi mešali še 24 h, nato pa jih uporabili za izdelavo NV oziroma za merjenje viskoznosti in prevodnosti. Raztopine z L smo pripravili po enakem postopku, le da smo ob ohladitvi raztopini PVA dodali še 10 % (m/ m) L, glede na celokupno koncentracijo polimera v raztopini.



Slika 6: Izgled raztopin PVA brez in z L.

3.1.3.2 Vrednotenje spremenljivk raztopin polimera

Merjenje viskoznosti raztopin polimera

Viskoznost smo izmerili vsem desetim uporabljenim raztopinam z različno koncentracijo PVA, brez in z dodanim L in sicer 24 h po njihovi pripravi, pri 25 °C, v vsaj dveh paralelkah. Uporabili smo oscilacijski rotacijski viskozimeter s senzorskim sistemom stožec ploščica. Meritve smo izvedli tako, da smo na ploščico nanesti približno 5 ml raztopine polimera, spustili stožec do ploščice in morebitni odvečni vzorec odstranili s papirnato brisačo tako, da ta ni segal čez rob stožca za več kot 1 mm. Meritve so potekale v območju strižne hitrosti od 1 do 100 1/ s in so bile vodene z računalniškim programom Rheo-logic, ki omogoča sproten prikaz izmerjenih točk na zaslonu ter izpis podatkov v obliki grafov in preglednic.



Slika 7: Reometer Physica MCR 301 s senzorskim sistemom stožec-plošča.

Merjenje prevodnosti raztopin polimera

Vsem raztopinam polimera smo pri sobni temperaturi določili tudi prevodnost, pri čemer smo meritve izvajali v treh paralelkah. Elektrodo s konstanto $0,7265 \text{ 1/cm}$ smo potopili v 50 ml merjene raztopine in na zaslonu odčitali prevodnost v $\mu\text{S/cm}$.

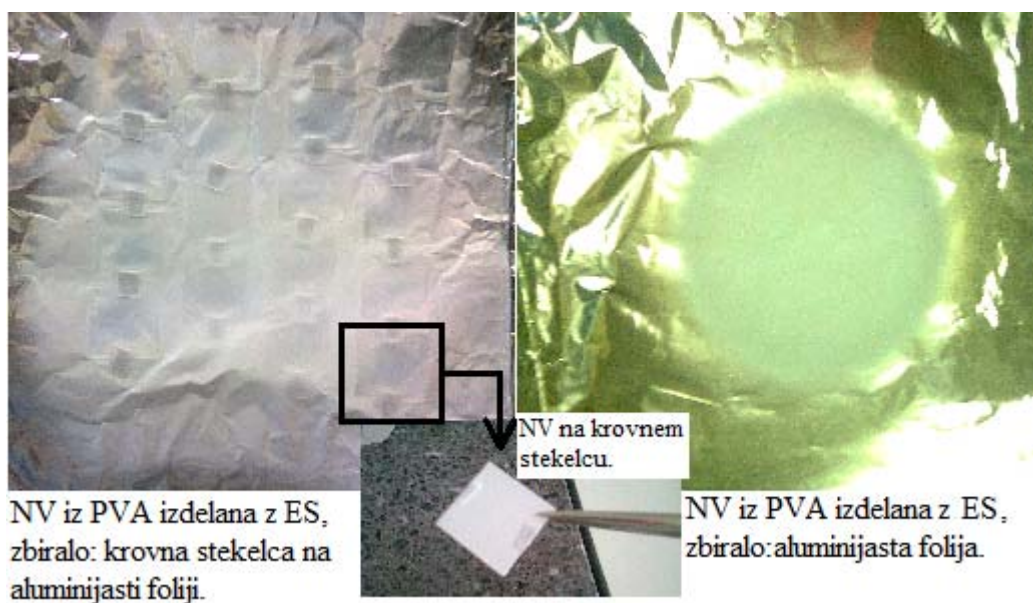


Slika 8: Merjenje prevodnosti raztopine polimera.

3.1.3.3 Izdelava in stabilizacija nanovlaken

Polimerna NV smo pripravili tako, da smo približno 5 ml raztopine polimera napolnili v plastično brizgo s kovinsko iglo ter iz nje iztisnili vse morebitne zračne mehurčke. Brizgo smo nato postavili na črpalko, ki je zagotavljala konstantni pretok $0,42 - 0,70 \text{ ml/h}$.

Razdaljo od konice igle do zbirala smo nastavili na 15 cm, električno napetost na 15 kV. Pogoje ES smo izbrali glede na predhodno opravljene raziskave na UL Fakulteti za farmacijo, ki so pokazali, da omenjeni pogoji omogočajo izdelavo NV iz PVA s stabilnim curkom, brez vozlov in z ustrezno velikostjo premera (26). Zbiralo, ki smo ga uporabili je bila aluminijasta folija nanesena na vertikalni planarni plastični nosilec. Nanjo smo z obojestranskim prevodnim lepilnim trakom nalepili velika krovna stekelca. Tako smo NV zbrali na krovnih stekelcih, kar nam je bistveno olajšalo nadaljnja testiranja, pri tem pa smo imeli na razpolago tudi vedno približno enake količine vzorca (stekelca smo enostavno izrezali iz aluminijaste folije, pri tem nismo poškodovali NV; na stekelce so se NV tudi dobro prijela). Izdelava NV je potekala 60 min pri sobni temperaturi, za uporabo NV za celice pa 10 min. Nato smo NV 24 h sušili pri sobni temperaturi.



Slika 9: Prikaz izdelanih NV iz PVA na zbiralu.

Stabilnost nestabiliziranih NV v vodnem mediju smo merili tako da, smo nanje nanesli fosfatni pufer s pH 7, 4. Ugotovili smo, da so se NV v hipu raztopila, saj se je barva aluminijaste folije spremenila iz bele nazaj v srebrno. Zaključili smo, da je za potrebe nadaljnega testiranja in uporabe stabilizacija NV nujna.

Za stabilizacijo NV smo izbrali tri različne fizikalne metode, in sicer namakanje v dveh netopilih (MeOH in EtOH) ter toploto. NV na krovnem stekelcu smo namakali 24 h pri sobni temperaturi v MeOH in EtOH v petrijevkah in jih nato 24 h sušili pri sobni

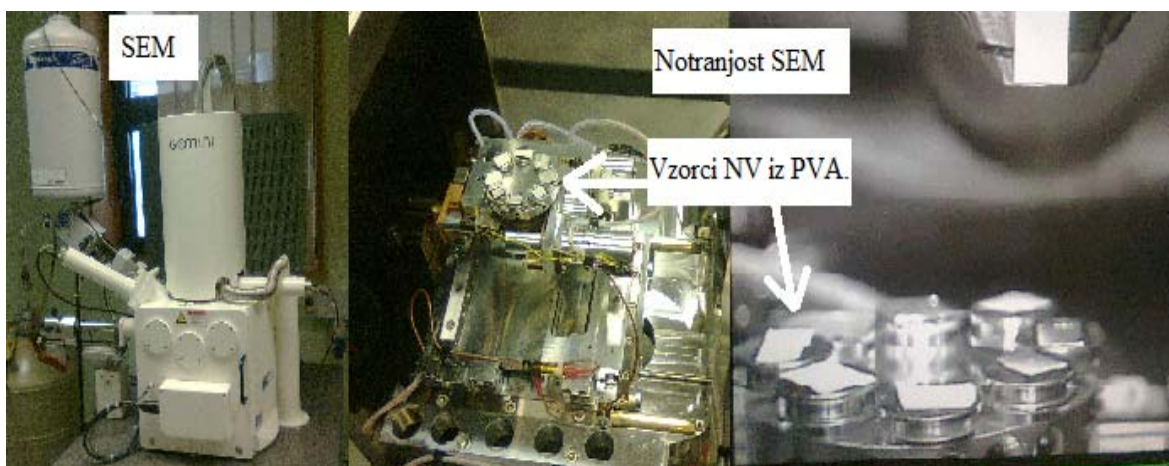
temperaturi. Toplotno stabilizacijo NV smo izvedli v sušilniku s suho toploto tako, da smo stekelca z NV zavili v aluminijasto folijo in jih 10 min segrevali na 160 °C.

Stabilizacijo NV, namenjenih za poskuse s celicami, pa smo izvedli le s toploto in sicer 30 min pri 160 °C.

3.1.3.4 Vrednotenje izdelanih nanovlaken

Morfološke lastnosti in povprečni premer izdelanih nanovlaken

Posušena NV na aluminijasti foliji smo narezali na majhne koščke (okoli 5 x 5 mm) in jih z obojestranskim lepilnim trakom prilepili na nosilce za SEM. Slike vzorcev nestabiliziranih in stabiliziranih NV, z ali brez zdravilne učinkovine L smo posneli in analizirali s SEM pri pospeševalni napetosti 1 kV in z uporabo sekundarnega detektorja. Iz slik pri različnih povečavah smo s pomočjo računalniškega programa ImageJ določili povprečni premer NV tako, da smo izmerili premere 50- im naključno izbranim NV.



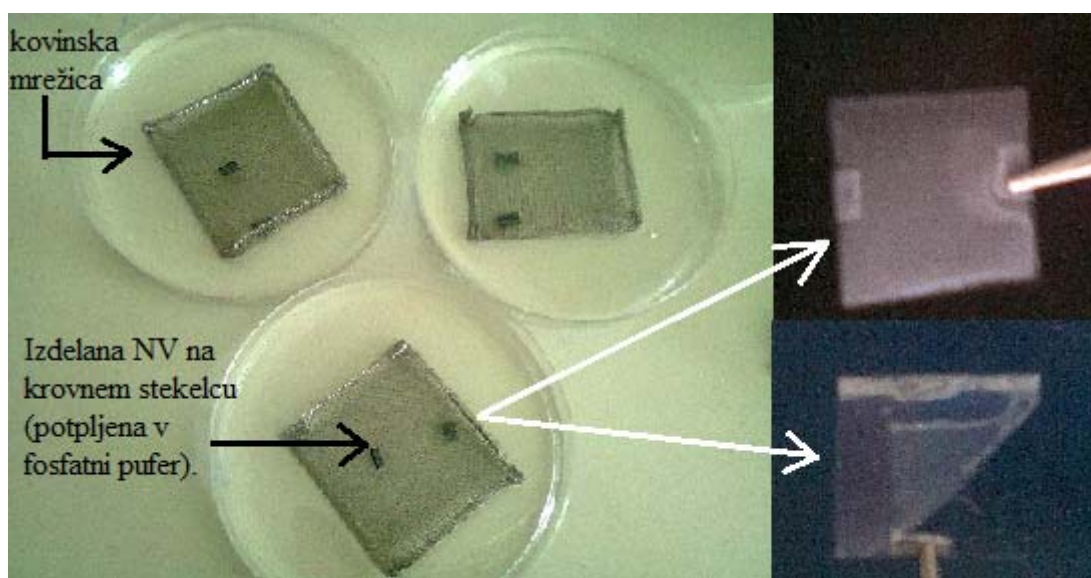
Slika 10: Prikaz vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM).

Priprava fosfatnega pufra

Za 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 NaOH ali HCl uravnali pH na 7, 4. Fosfatni puffer smo nato uporabljali za določevanje hidratacije in erozije NV- PVA ter za sproščanje L iz NV- PVA- L.

Razvoj metode za določanje hidratacije in erozije izdelanih nanovlaken

Metodo za določanje hidratacije in erozije NV smo deloma povzeli po literaturi, delno pa smo jo razvili sami. Preučevali smo nabrekanje oziroma hidratacijo in erozijo stabiliziranih NV- PVA v fosfatnem pufru s pH 7, 4 pri sobni temperaturi, pri čemer smo za vsak vzorec izmerili v treh paralelkah. Fosfatni pufer s pH 7, 4 smo izbrali zato, da bi čim pristneje posnemali fiziološke pogoje. Stabilizirane suhe vzorce z izbranimi NV smo tako pred začetkom postopka stehali in rezultate označili kot maso suhega vzorca. Nato smo vzorce prenesli v plastične petrijevke in jih prelili s pripravljnim fosfatnim pufrom. Po 5 sekundah smo stekelca z NV vzeli iz pufrne raztopine, jih na papirnati brisači, ki ni odpuščala delcev, osušili in ponovno stehali. Vsak vzorec smo nato na enak način stehali še po 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 in 96 h. Iz dobljenih meritev smo izračunali odstotke povečanja ali zmanjšanja mase preučevanega vzorca glede na maso suhega vzorca.



Slika 11: NV na krovnem stekelcu, potopljena v fosfatni pufer s pH= 7, 4 med izvedbo postopka za določanje njihove hidratacije in erozije.

3.1.3.5 Sproščanje zdravilne učinkovine levofloksacina iz izdelanih nanovlaken

Analiza zdravilne učinkovine levofloksacina

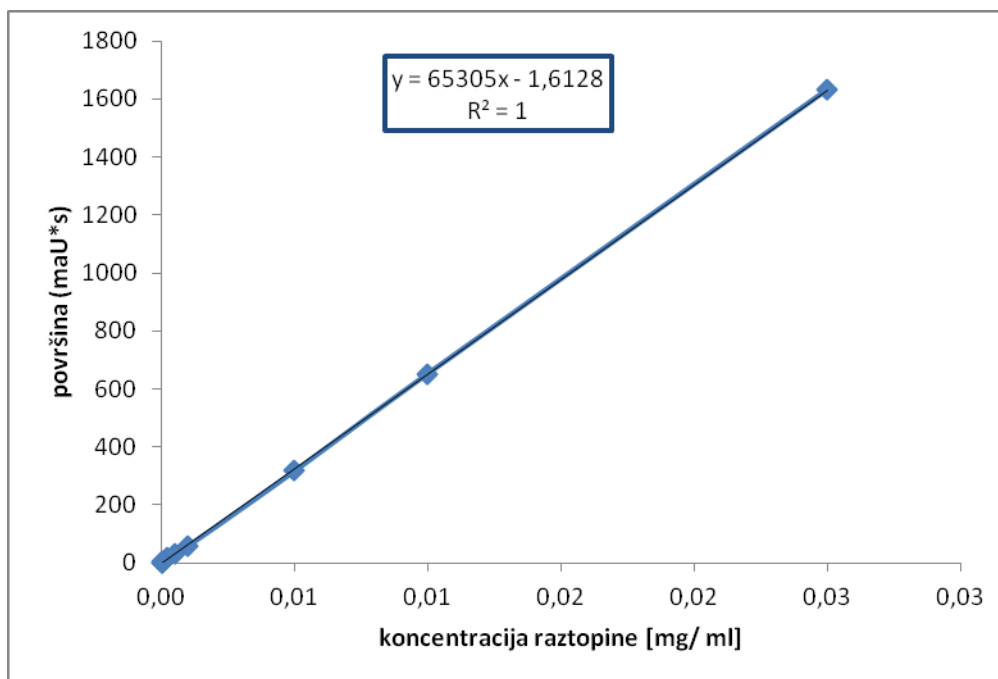
Najprej nas je zanimala stabilnost L v fosfatnem pufru pri sobni temperaturi in njegova čistost. V ta namen smo natehtali določeno količino L, jo raztopili v fosfatnem pufru in mešali 2 h, nato pa postopali enako kot pri pripravi raztopin polimera. Ker L zaznamo z

UV svetlobo, smo njegovi raztopini najprej izmerili celoten absorpcijski spekter, določili absorpcijski maksimum, ki je bil 287 nm, ter odčitali absorbanco. Za preverjanje stabilnosti L smo nato ponovili meritve z isto raztopino in sicer po 24 h ter po petih dneh, ter ugotavljali ali je med tem prišlo do spremembe absorbance s časom.

Čistost in stabilnost L v MeOH, EtOH in pri povišani temperaturi smo analizirali s postopkom HPLC, objavljenim v literaturi (22). Ugotovili smo namreč, da analitika z UV svetlobo ni primerna za določanje čistosti, saj z njo ne moremo zaznati morebitnih nečistot in razgradnih produktov v vzorcu, poleg tega pa je v MeOH in EtOH prišlo tudi do premika absorpcijskega maksimuma. Za analizo s HPLC smo pripravili osnovne raztopine L s koncentracijo 0,3 mg/ml, ki smo jih nato redčili 1/100, v topilih voda: acetonitril 60/40, MeOH in EtOH. Pripravili pa smo tudi osnovno raztopino s koncentracijo 0,3 mg/ml iz predhodno toplotno stabiliziranega L (10 min na 160 °C), v topilu voda: acetonitril 60/40, da bi določili stabilnost L pri povišani temperaturi. Ker smo želeli preveriti stabilnost in čistost L v fosfatnem pufru tudi s HPLC, smo pripravili tudi njeno raztopino (0,3 mg/ml) v fosfatnem pufru. Vse raztopine smo pred analizo mešali 2 h na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi.

Umeritvena premica za levofloksacin

Osnovno raztopino L s koncentracijo 0,025 mg/ml smo pripravili tako, da smo natehtali 12,5 mg L, ga kvantitativno prenesli v 500 ml bučko in to napolnili do oznake s fosfatnim pufrom s pH 7,4. Čeprav se umeritvena premica za analitiko HPLC pogosteje določi v mobilni fazi kot v topilu, pa smo v našem primeru raje uporabili fosfatni pufer, saj sta se oblika kromatografskih pikov v pufru in v mobilni fazi razlikovali. Osnovno raztopino smo nadalje redčili tako, da smo dobili naslednje koncentracije analita 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,00025, 0,0001, 0,00005, 0,00004 in 0,00003 mg/ml. Najnižjo koncentracijo smo določili glede na mejo detekcije sistema HPLC, umeritveno premico pa izdelali s pomočjo dobljenih meritev dveh osnovnih raztopin.



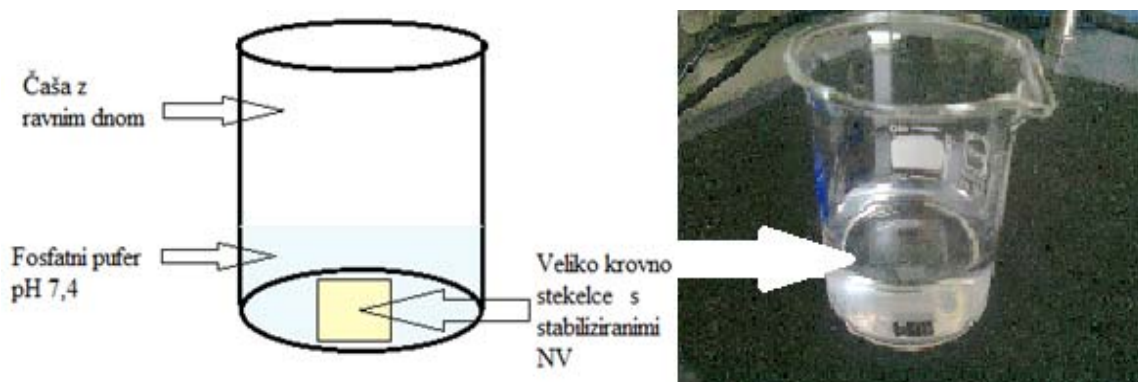
Slika 12: Umeritvena premica: odvisnost površin kromatografskih vrhov od koncentracije raztopine L v fosfatnem pufru s pH 7, 4. V zgornjem okvirčku je enačba premice, kjer y predstavlja površino pod kromatografskimi vrhovi, x pa koncentracijo L.

Razvoj modela za izvedbo sproščanja levofloksacina iz nanovlaken

Ker je primaren namen uporabe naših NV izdelava obloge za rane, smo model za sproščanje L iz NV skušali čim bolj približati realni situaciji pri celjenju. V ranah je koža poškodovana, zato ni kožne bariere, ki bi predstavljala oviro pri prehajanju zdravilne učinkovine. Zdravilna učinkovina lahko zato iz NV prehaja na mesto delovanja s preprosto difuzijo. Zato smo uporabili naslednji model sproščanja L iz NV- PVA- L (slika 12): v majhno čašo (40 ml) z ravnim dnom smo položili izbrana stabilizirana NV- PVA- L nameščena na krovno stekelce in sicer tako, da je bila stran stekelca, na katerem so bila vlakna, obrnjena navzgor. Nato smo preko krovnega stekelca z NV v čaši nalili 20 ml fosfatnega pufru s pH 7, 4. Iz sredine medija smo nato v enakih časovnih intervalih odvzemali po 1000 µl vzorca in ga sproti nadomeščali s svežim pufrom, da smo zadostili pogojem »sink«. Časovni intervali jemanja vzorcev so bili: 2`5, 5, 7`5, 10, 12`5, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120, 180, 240, 300, 360, 420 in 480 min ter 24, 48, 72 h in 7 dni. Sproščanje je potekalo pri sobni temperaturi, vzorce pa smo jemali v treh paralelakah. Iz meritev smo izračunali delež sproščanja in sicer ob predpostavki, da se po sedmih dnevih iz NV sprosti celotna količina vgrajenega L ter na podlagi tega izračunali

kumulativni delež (vse meritve, ki smo jih izmerili v analizi in meritev vzorca) sproščene zdravilne učinkovine v različnih časovnih intervalih.

Sprva smo poskušali L analizirati spektrofotometrično pri valovni dolžini 287 nm, saj je to najenostavnejša in najhitrejša metoda za njegovo detekcijo. Vendar pa rezultati tovrstnih meritev in umeritvena premica pri tako nizkih koncentracijah L (masa NV od 0,5 do 1 mg, vsebnost L pa od 0,05 do 0,1 mg), kot smo jih imeli v naših vzorcih, niso bili dovolj natančni. Čeprav smo poskus večkrat ponovili, pa smo kljub temu med posameznimi vzorci zaznali izredno velike razlike, pri čemer so profili sproščanja nakazovali eksperimentalno napako. Zato smo za analiziranje L zbrali metodo HPLC, ki nam je omogočila merjenje zelo nizkih koncentracij (22).



Slika 13: Shematski prikaz eksperimentalnega modela za ugotavljanje obsega sproščanja L iz NV.

Priprava mobilne faze in vrednotenje vsebnosti levofloksacina z metodo HPLC

- Sestava mobilne faze: 25,5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; za 1 L smo natehtali 3,900 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ga kvantitativno prenesli v bučko, dodali trietilamin in dvakrat prečiščeno vodo ter z ortofosforno kislino umerili pH na vsebnost 6;
- Sestava topila za spiranje kolone: MeOH za tekočinsko kromatografijo in dvakrat prečiščena voda v razmerju 30:70;
- Uporabili smo kolono Symmetry C 18, z dolžino 250 mm, notranjim premerom 4,6 mm in velikostjo delcev 5 μm ;
- Volumen avtomatsko injiciranega vzorca je bil 20 μl ;
- Pretok mobilne faze 1 ml/min;
- Sistem je bil termostatiran na 40 °C, temperatura vzorca je bila 18 °C;
- Čas potovanja enega vzorca po koloni je bil 30 min (22).

3.2 BIOLOŠKI ODZIV KERATINOCITOV NA PODLAGO IZ NANOVLAKEN *IN VITRO*

3.2.1 Materiali

- Barvilo za aktin:
 - rdeče obarvanje: faloidin tetrametilrodamin B izotiocianat, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Nemčija,
 - zeleno obarvanje: faloidin, fluorescein izotiocianat labeled, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Nemčija;
- Barvilo za jedra: modro obarvanje, Hochst 33342, bisbenzimid, Riedel de Haen ®, Nemčija;
- Celična linija keratinocitov (NCTC2544), ICLC, Univerza v Genovi, Italija;
- Fosfatni pufer;
- Priprava gojišča 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 aminokisljine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija,
 - 2 mM L-glutamin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija,
 - 100 U/ mL mešanice antibiotik/ antimikotik: 10 000 IU penicilin, 10 mg streptomycin, 2, 5 µg amfotericin B, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija;
- Prolong ® Antifade Kit (reagent proti bledenju fluorescence), Invitrogen, Molecular Probes TM, ZDA;
- Sterilna voda: dvakrat prečiščena voda, sterilizirana po postopku za sterilizacijo tekočin (121 °C, 20 min);
- Plastenka za gojenje celic;

- Triton® X- 100, Merck, Darmstadt, Nemčija;
- 4 % raztopina formalina ali paraformaldehida, Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Nemčija;
- 15 in 30 ml centrifugirke.

3.2.2 Naprave

- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka, Iskra Pio, Slovenija;
- Centrifuga Centric 322A, Tehtnica, Slovenija;
- Fluorescenčni mikroskop, Olympus IX 81, Japonska ;
- Fotoaparat, Olympus, Japonska;
- Inkubator za celične kulture, Sanyo, Japonska;
- Neubauerjeva komora za štetje celic;
- Različne sterilne pipete;
- Svetlobni mikroskop CKX41, Olympus, Japonska.

3.2.3 Postopki in metode

3.2.3.1 Gojenje in presajanje celic

Keratinocite smo gojili v posodi za gojenje celic s površino 75 cm², v prisotnosti medija. Ko so celice prerasle 70 % površine posode (70 % konfluentnost), kar smo spremljali z invertnim svetlobnim mikroskopom, smo jih presadili. Ta postopek smo izvedli tako, da smo iz posode previdno odlili medij, celice, pritrjene na plastično površino pa so ostale v posodi. Posodo smo nato dvakrat sprali s po 3 ml steriliziranega fosfatnega pufra in ga vsakič odlili. Nato smo v posodo dodali 1, 0 ml encima tripsina (v koncentraciji od 0, 025 do 0, 5 %), ki je omogočil, da so se celice odlepili od posode in druga od druge. Ta postopek smo spremljali pod svetlobnim mikroskopom. Nato smo v posodo dodali 4 ml medija za keratinocite, s katerim smo inaktivirali preostali tripsin, da ne bi poškodovali celic. Sproščene celice smo suspendirali v mediju in jih odpipetirali v 15 ml centrifugirke

ter cetrifugirali 5 min pri 1300 vrtljajih/ min. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v svežem mediju. Celično suspenzijo smo nato prenesli v sveže gojilne posode, v katere smo predhodno odpipetirali po 12 ml svežega medija in jih inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂, v zraku, toliko časa, da so dosegle 70 % konfluentnost, nato pa smo postopek celičnega presajanja ponovili.

Ustrezno gostoto celic v novih posodah za gojenje smo zagotovili s predhodnim štetjem celic. Po končanem centrifugiranju in resuspendiranju celic v 1 ml svežega medija smo odpipetirali 50 µl celične suspenzije, jo razredčili s 50 µl medija in vzorec nanесли v Neubauerjevo komoro, v kateri smo jih prešteli v vseh štirih poljih hemocitometra (4 x 16) in izračunali njihovo število v izhodni suspenziji, kot sledi:

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

3.2.3.2 Priprava nanovlaken za njihovo biološko vrednotenje *in vitro*

Izbrana s toploto stabilizirana NV- PVA na krovnih stekelcih smo prenesli na plošče s 6 vdolbinami in sicer v vsako od vdolbin po eno krovno stekelce. Nato smo v vsako vdolbino dodali po 3 ml medija za keratinocite in po 10⁴ celic. Kot kontrolo smo v vdolbinice dali le krovna stekelca brez NV, dodali po 3 ml medija in nato nanесли še 10⁴ celic. Kulture smo inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku in sicer 24 in 72 h. Celice smo vsak dan opazovali pod invertnim mikroskopom.

3.2.3.3 Vrednotenje vpliva nanovlaken na keratinocite

S fluorescenčnim mikroskopom smo spremljali morfologijo, gostoto in rast celic na izbranih NV- PVA. Za opazovanje celic pod fluorescenčnim mikroskopom smo iz vdolbinic odpipetiral medij in vzorce sprali z 1 ml fosfatnega pufra. Nato smo jim dodali po 500 µl 4 % raztopine formalina ter s tem fiksirali celice. Formalin namreč tvori inter- in intramolekulare kovalentne vezi z aminskimi skupinami proteinov in nukleinskih kislin, s čimer prepreči razkroj celic zaradi delovanja proteaznih encimov. Formalin smo pustili

delovati 10 minut pri sobni temperaturi, nato pa ga odpipetirali in vzorce sprali s po 1 ml fosfatnega pufra. Nato smo jim dodali po 500 μ l 0, 25 % raztopine Tritona- X 100, ki omogoči permeabilizacijo celične membrane in s tem vstop fluorescenčnih barvil v celico. Tudi Triton- X 100 smo pustili delovati 10 min pri sobni temperaturi in ga nato odpipetirali ter vzorce sprali s po 1 ml fosfatnega pufra. Sledil je dodatek 500 μ l raztopine barvila za celična jedra, v koncentraciji 5 μ g/ ml in inkubacija 30 min pri sobni temperaturi. Vzorce smo zaščitili pred svetlobo, saj je barvilo občutljivo na svetlobo. Po končani inkubaciji smo višek barvila odstranili tako da, smo vzorce sprali s po 1 ml fosfatnega pufra. Nato smo dodali še po 500 μ l barvila za aktin in sicer v koncentraciji 1, 1 μ g/ ml ter jih inkubirali v temi 30 minut pri sobni temperaturi. Višek barvila smo odpipetirali in vse vzorce dvakrat sprali s po 1 ml fosfatnega pufra. Na predhodno označeno objektno stekelce smo nanesti kapljico reagenta proti bledenju fluorescence in nanj položili rahlo osušeno krovno stekelce z NV in celicami. V temnem prostoru pri sobni temperaturi smo tako pripravljene vzorce sušili 48 h, nato pa robove krovnih stekelc polakirali z navadnim lakom za nohte in jih pregledali pod fluorescenčnim mikroskopom.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 LASTNOSTI RAZTOPIN POLIMERA

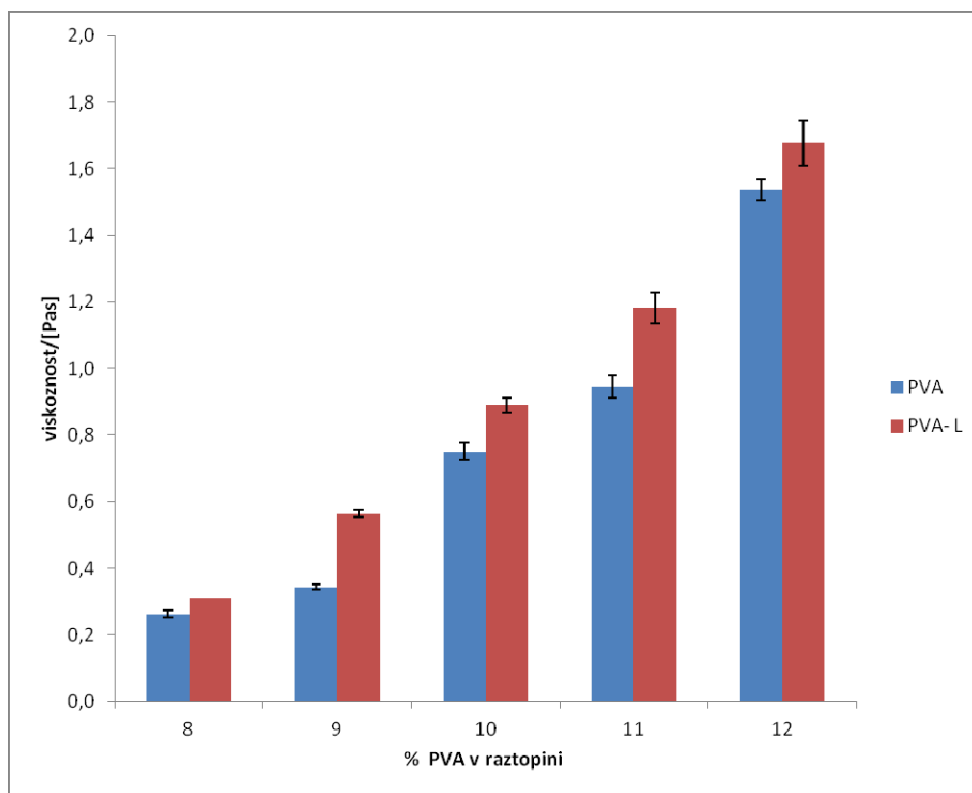
4.1.1 Viskoznost

Viskoznost raztopine polimera je lastnost tekočine in je ena izmed spremenljivk, ki pomembno vplivajo na proces izdelave NV z ES. Kot smo že omenili, morajo biti raztopine polimera ravno prav viskozne, da lahko iz njih s postopkom ES izdelamo NV. Raziskovalci so ugotovili, da se primerna viskoznost poljubne raztopine polimera giblje med 0,1 in 21,5 Pas (12).

Konc. raztopine PVA [%]	Viskoznost [Pas]	Konc. raztopine PVA in L [%]	viskoznost [Pas]
8	0,26	8	0,31
9	0,34	9	0,56
10	0,76	10	0,89
11	0,95	11	1,17
12	1,54	12	1,67

Tabela II: Rezultati meritev viskoznosti vseh PVA raztopin brez in z L.

Slika 14 prikazuje viskoznost raztopin PVA v odvisnosti od koncentracije polimera in dodanega L. Vidimo, da viskoznost raztopin s povečevanjem koncentracije polimera eksponentno narašča. Bolj koncentrirane raztopine namreč vsebujejo večje število polimernih verig, kar privede do večjega števila interakcij med njimi, polimerom in topilom in s tem posledično do višje viskoznosti (3, 12, 26). Povprečni porast viskoznosti z naraščajočimi koncentracijami je za raztopine PVA 0,32 Pas, za raztopine PVA z L pa 0,34 Pas, pri čemer je višanje viskoznosti z naraščajočo koncentracijo PVA bolj enakomerno v raztopinah z dodanim L.



Slika 14: Vpliv koncentracije PVA in L na viskoznost raztopin; vsebnost L je v vseh primerih 10 %, glede na vsebnost PVA.

Dodatek L k raztopinam polimera se odraža v majhnem porastu viskoznosti raztopin z določeno koncentracijo in sicer v povprečju za 0, 16 Pas. Ugotovili smo tudi, da lahko največjo razliko med viskoznostjo raztopine PVA z in brez L zaznamo pri 11 % koncentraciji, najmanjšo pa pri 8 in 10 %. Izsledki objavljenih raziskav so si glede vpliva učinkovin na viskoznost raztopin polimerov neenotni. Tako so Taepaiboon, Rungsardthong in Supaphol pri vgrajevanju štirih različnih nesteroidnih protivnetnih učinkovin v 10 % raztopine PVA v vodi ugotovili, da se viskoznost raztopin po dodatku učinkovine v določenih primerih zmanjša, v drugih pa poveča. Dodatek salicilne kisline je viskoznost zmanjšal, medtem ko so jo dodatki diklofenaka, indometacina ali naproksena zvišali (7). Jannesari, Varshosaz, Morshed in Zamani so v 5 % polimerne raztopine PVA pripravljene v 50 % očetni kislini vgradili ciprofloksacin in ugotovili, da je pri tem prišlo do zmanjšanja viskoznosti raztopine. Ciprofloksacin naj bi v tem primeru deloval kot plastifikator (19). Menimo, da lahko različne rezultate pripišemo tako različnim polimernim sistemom kakor tudi različnim zdravilnim učinkovinam. Nobena raziskovalna skupina do sedaj pa še ni preučevala vgradnje L v raztopine PVA, zato nismo mogli primerjati dobljenih rezultatov.

Iz naših izsledkov tako sklepamo, da je v raztopini polimera zaradi dodatka L prišlo do sprememb, npr. konformacije polimernih verig, ki povzročijo njihovo večje medsebojno povezovanje in povezovanje s topilom ter s tem nastanek višje viskoznosti. Ugotovili smo tudi, da so raztopine pripravljene iz PVA in PVA z dodanim L primerne za izvedbo ES, saj ustrezajo zahtevanemu intervalu viskoznosti (0, 1- 21, 5 Pas), ki omogoča primeren pretok skozi iglo ter tvorbo stabilnega nitastega curka med procesom izdelave NV.

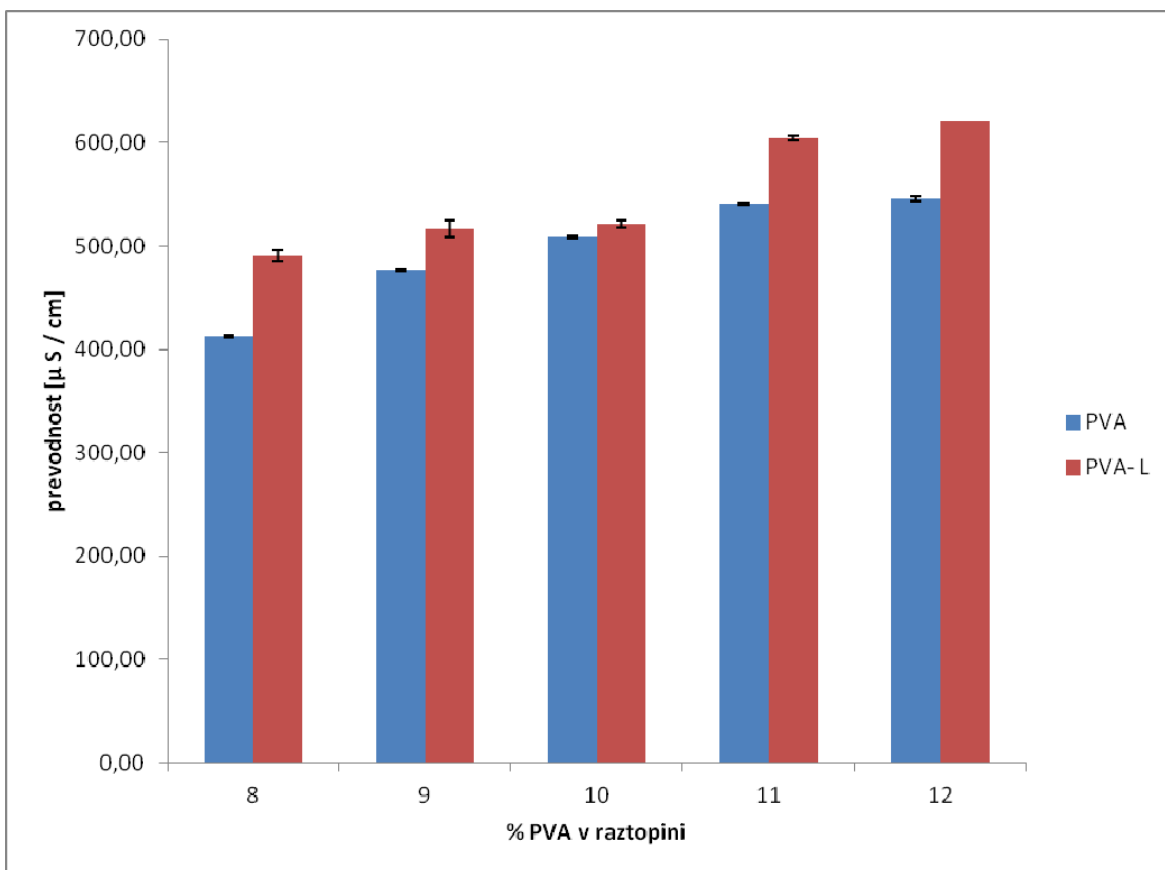
4.1.2 Prevodnost

Prevodnost je lastnost snovi, ki jo podaja razmerje med gostoto električnega toka in jakostjo električnega polja in jo določajo predvsem nabiti delci v tekočini (27). Tudi ta lastnost mora ustrezati pogojem za pripravo NV z ES.

Konc. raztopine PVA [%]	Prevodnost [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	Konc. raztopine PVA in L [%]	Prevodnost [$\mu\text{S}/\text{cm}$]
8	413	8	490
9	476	9	517
10	509	10	521
11	541	11	604
12	549	12	621

Tabela III: Rezultati meritev prevodnosti vseh uporabljeni raztopin PVA brez in z L.

Slika 15 nazorno prikazuje prevodnost raztopin PVA v odvisnosti od koncentracije in dodatka zdravilne učinkovine L. Vidimo, da tako koncentracija polimera kot dodatek učinkovine L zvišata prevodnost raztopin, pri čemer je njeno zvišanje s koncentracijo bolj enakomernejše v raztopinah brez L. Povprečno povečanje prevodnosti s povečevanjem koncentracije je bilo za čiste raztopine PVA in za raztopine z dodanim L $33 \mu\text{S}/\text{cm}$. Razlike v prevodnosti raztopin PVA brez L so bile večje v primeru 8, 9 in 10 % raztopin, medtem ko sta se 11 in 12 % raztopini razlikovali le za $5 \mu\text{S}/\text{cm}$. Najmanjšo razliko v raztopinah z in brez L pa smo ugotovili v raztopini z 10 % koncentracijo PVA. Znašala je $13 \mu\text{S}/\text{cm}$.



Slika 15: Vpliv koncentracije PVA in L na prevodnost raztopin; vsebnost L je v vseh primerih 10 %, glede na vsebnost PVA.

Vzrok porasta prevodnosti raztopin polimera s povečevanjem koncentracije polimera lahko pripišemo nizki vsebnosti soli, ki jo vsebuje PVA, kot to navaja proizvajalec (28). Bolj koncentrirane raztopine imajo poleg večje vsebnosti polimera tudi višjo vsebnost soli, to pa poveča njihovo prevodnost. Manjši porast prevodnosti v raztopinah z najvišjo koncentracijo polimera (11 in 12 %) je posledica visoke viskoznosti. Ta namreč začne ovirati mobilnost ionov, kar ima za posledico manjšo izmerjeno prevodnost. Očitno je tudi, da dodatek L še poveča prevodnost raztopin, čeprav učinkovina ni v obliki soli. Ta pojav lahko razložimo z obnašanjem L v destilirani vodi. Učinkovina L ima namreč pKa karboksilne skupine 5, 5, pKa piperazinilne skupine 8, 0 in pKa druge protonakceptorske skupine od 6, 8 +/- 0, 3, medtem ko je pH destilirane vode pripravljene na FFA okoli 8. To pa pomeni, da je delež L, ki se delno obnaša kot kislina, v takšnem mediju v ionizirani obliki, zato je prevodnost njegove raztopine večja. Seveda pa lahko prevodnost ob dodatku L dodatno povišajo tudi morebitne nečistote prisotne v učinkovini, ki nastanejo med njeno proizvodnjo.

4.2 VREDNOTENJE POGOJEV ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA

Procesne spremenljivke ES močno vplivajo na morfologijo in premer izdelanih NV. Najpomembnejši procesni parametri, ki jih med ES lahko spreminjamo ob konstantnih lastnostih raztopin polimerov so, električna napetost, razdalja od konice igle do zbirala ter pretok polimerne raztopine skozi ozko iglo. Na FFA so predhodno že opravili analize omenjenih parametrov za različno koncentrirane raztopine PVA (26).

Za izdelavo NV smo izbrali razdaljo od konice igle do zbirala 15 cm, saj smo na ta način z vsemi koncentracijami raztopin PVA dokazali stabilen curek med postopkom ES, na zbiralu pa dobili suha NV, kar pomeni, da je imelo topilo na tej razdalji dovolj časa za popolno izhlapevanje.

Pretok raztopine polimera skozi ozko iglo smo morali med procesom ES le minimalno spreminjati glede na uporabljeno koncentracijo PVA in sicer tako da, smo med celotnim procesom imeli stabilen nitast curek, ki je izhajal iz Taylor-jevega stožca. Kot je prikazano v tabeli IV, smo morali pri višjih koncentracijah raztopine polimera uporabiti malenkostno višji pretok črpalke, ker je bilo zaradi večje viskoznosti potrebno uporabiti večjo potisno silo.

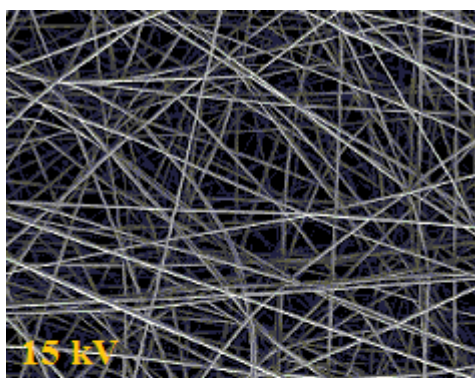
Tabela IV: Hitrosti pretoka raztopin PVA skozi iglo med procesom ES brez in z dodanim L.

Konc. raztopine PVA [%]	Pretok [ml/ h]	Konc. raztopine PVA in L [%]	Pretok [ml/ h]
8	0, 42	8	0, 63
9	0, 56	9	0, 63
10	0, 49	10	0, 70
11	0, 63	11	0, 70
12	0, 56	12	0, 70

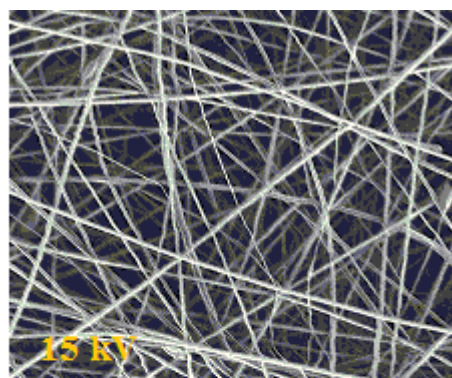
Napetost električnega polja je nedvomno najpomembnejša spremenljivka tehnološkega postopka. Omogoča oblikovanje nitastega curka in njegovo potovanje skozi električno polje do zbirala (3). Za izdelavo NV iz PVA smo, glede na predhodne raziskave, izbrali

26). Pri omenjeni napetosti smo izdelali NV iz vseh uporabljenih PVA raztopin in jih ovrednotili s SEM (slika 16). Analiza slik je pokazala, da so pod izbranimi pogoji nastala NV brez vozlov, poleg tega pa smo videli, da se je med samim procesom tvoril stabilen in kontinuiran curek raztopine polimera. Kljub temu smo še dodatno preverili, kako sprememba napetosti vpliva na proces ES in na morfologijo izdelanih NV. Zato smo izvedli postopek ES z 10 % raztopino PVA še pri 25 kV in sicer ob enaki razdalji in pretoku, ter primerjali rezultate. Ugotovili smo, da pri višjih napetostih nastanejo NV z vozli, kar lahko pripišemo spremembi oblike kapljice na konici igle. S povečevanjem napetosti se namreč volumen kapljice zmanjšuje, nitast curek pa se tvori neposredno iz konice igle, kar povzroči nastanek NV z večjo pojavnostjo vozlov. Opazili smo tudi, da je med postopkom ES pri večjih napetostih večkrat prišlo do prekinitve nitastega curka. Po drugi strani pa na vlaknih izdelanih iz 11 % raztopine PVA, ki smo jih pripravili pri 20 kV, nismo opazili takih vplivov, saj so bila v tem primeru NV tudi pri višji napetosti gladka, curek raztopine pa stabilen in neprekinjen. Ugotovili smo, da so pri izdelavi NV iz 12 % raztopine PVA pri napetosti 10 kV ponekod nastala siamska vlakna, kar je posledica visoke koncentracije uporabljene raztopine PVA.

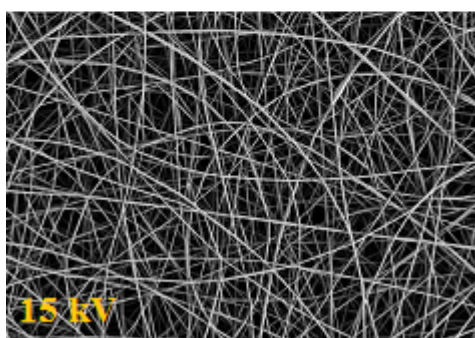
Iz dobljenih rezultatov tako sklepamo, da povečanje ali zmanjšanje napetosti za samo 5 kV nima bistvenega vpliva na proces izdelave NV z ES in na njihovo morfologijo, medtem ko povečanje za 10 kV že pomembno prizadene tako proces izdelave (nestabilnost curka) kot tudi morfologijo NV (več vozlov) (slika 16).



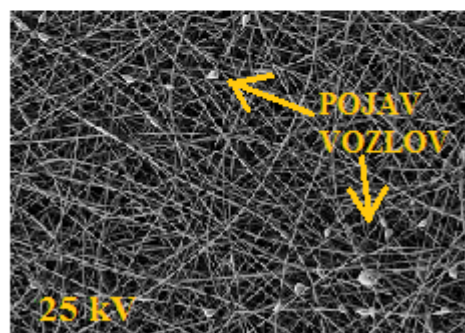
NV iz 8% polimerne raztopine PVA.



NV iz 9% polimerne raztopine PVA.



NV iz 10% polimerne raztopine PVA.



NV iz 10% polimerne raztopine PVA

Slika 16: Posnetki SEM NV izdelanih iz 8, 9 in 10 % raztopin PVA pri 15 kV ter iz 10 % raztopine PVA pri 25 kV; povečava: 5. 000 x.

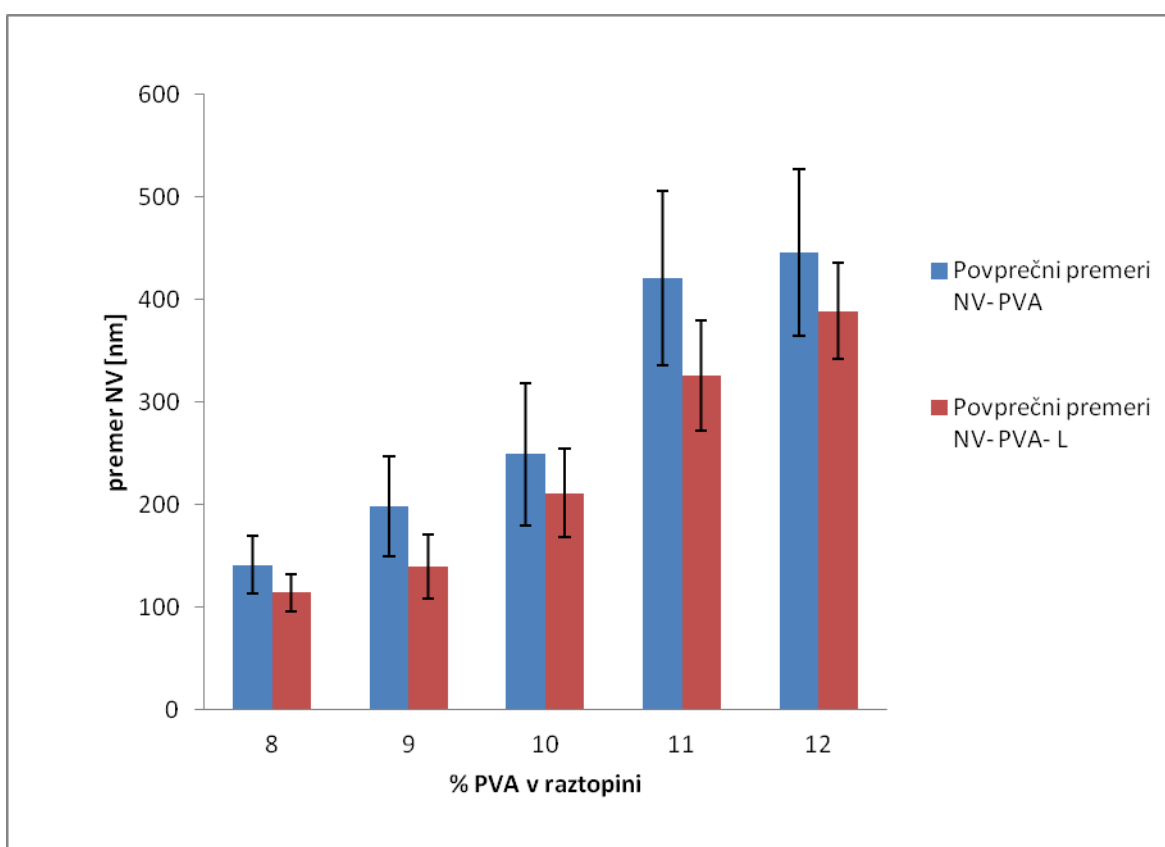
4.3 VREDNOTENJE IZDELANIH NANOVLAKEN

Iz posnetkov dobljenih z elektronskim mikroskopom (SEM) smo z računalniškim programom ImageJ ugotavljali, kako na povprečni premer in morfologijo izdelanih NV vplivajo:

- spremenljivke raztopine polimera (koncentracija, viskoznost in prevodnost),
- vgraditev zdravilne učinkovine (L),
- stabilizacija NV z MeOH, EtOH in temperaturo.

4.3.1 Vpliv koncentracije polivinilalkohola na povprečni premer nanovlaken

Iz slike 17 je razvidno, da povprečni premer izdelanih NV- PVA in NV- PVA- L narašča s koncentracijo raztopine polimera, iz katere so bila izdelana. Povprečno povečanje premerov NV med uporabljenimi koncentracijami polimera je bilo v primeru NV- PVA 76 nm, v primeru NV- PVA- L pa 69 nm, pri čemer je bil porast enakomernejši pri NV- PVA- L. Naši rezultati potrjujejo že objavljene, ki so pokazali, da dajejo raztopine z višjo viskoznostjo, zaradi večjega prepleta polimernih verig v raztopini, NV z večjim premerom (4, 12).



Slika 17: Vpliv koncentracije raztopine polimera in vpliv vgrajenega L na povprečni premer izdelanih NV; vsebnost L je v vseh primerih 10 %, glede na vsebnost PVA.

4.3.2 Vpliv vgrajenega levofloksacina na povprečni premer nanovlaken

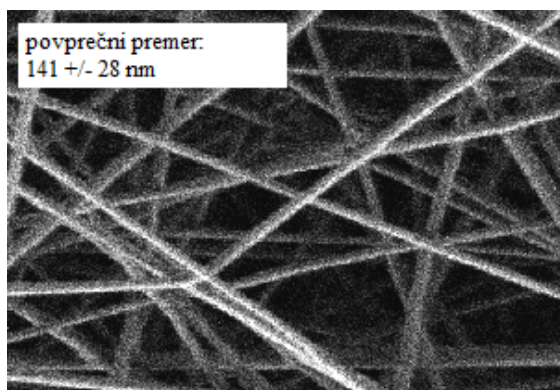
Slika 17 dodatno prikazuje tudi vpliv L na povprečni premer NV. Vidimo, da dodatek L k vsem uporabljenim koncentracijam raztopin PVA zmanjša premer nastalih NV, pri čemer

je najmanjša sprememba premera prisotna pri NV nastalih iz 8 in 10 % raztopine PVA. Ta vpliv lahko razložimo na podlagi lastnosti raztopin. Ugotovili smo namreč, da sta se tako viskoznost kot prevodnost raztopin po dodatku L povečali. Večja viskoznost raztopin polimera sicer v splošnem poveča povprečni premer izdelanih NV. Ker pa so takšne raztopine hkrati tudi bolj prevodne, nosijo večjo gostoto naboja curka, s tem pa se zaradi večje moči elektrostatskih odbojnih sil curek tanjša. Posledično nastanejo NV z manjšim premerom. Ker oba omenjena parametra določata faktor sil, ki skupno delujejo na curek, lahko glede na dobljeni rezultat, sklepamo, da prevladajo odbojne sile zaradi povečane prevodnosti, to pa ima za posledico zmanjšanje premera NV. Sprememba prevodnosti raztopine polimera ima torej očitno večji vpliv na povprečni premer izdelanih NV kot sprememba njene viskoznosti. Do podobnih ugotovitev so v svojih raziskavah prišli tudi Taepaiboon in sodelavci (7).

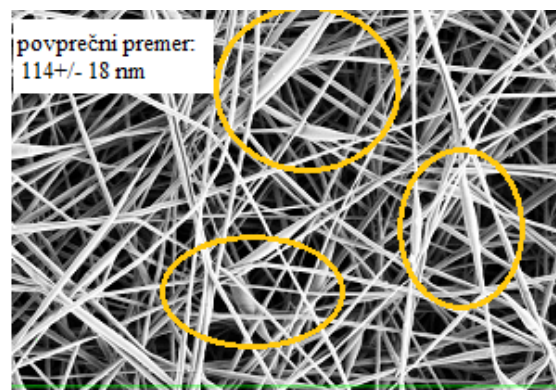
4.3.3 Vpliv vgrajenega levofloksacina na morfologijo nanovlaken

Večina NV izdelanih iz različnih raztopin PVA brez in z dodatkom L je bila gladkih, okroglih in brez vozlov (slika 18). Dodatek L k manj koncentriranim polimernim raztopinah (8 in 9 %) je povzročil pojav manjšega števila vozlov, v primeru bolj koncentriranih raztopin (10, 11 in 12 %) pa vozlov nismo opazili. To pripisujemo večji stabilnosti curka bolj koncentriranih raztopin med postopkom ES. Ob primerjavi naših rezultatov z izsledki drugih študij smo ponovno opazili, da so si ti zelo neenotni. Tako so npr. Taepaiboon in sodelavci pri vgradnji štirih različnih učinkovin v NV iz PVA ugotovili, da salicilna kislina in diklofenak povzročita nastanek NV z večjim številom vozlov, medtem ko so po dodatku naproksena ali indometacina nastala NV brez vozlov. Pojavnost vozlov so do neke mere lahko razložili s podatki o površinski napetosti raztopin polimera, iz katerih so izdelali NV, vendar pa niso uspeli pojasniti, zakaj nekatere zdravilne učinkovine vplivajo na nastanek vozlov, druge pa ne (7). Poudariti je potrebno, da je pomembna lastnost raztopine polimera, ki močno vpliva na proces ES in morfologijo nastalih NV, tudi površinska napetost, vendar pa te zaradi odsotnosti ustrezne aparature v času izdelave diplomskega dela, žal nismo mogli ovrednotiti. V splošnem pa sicer velja, da večja površinska napetost raztopine polimera onemogoča proces ES, saj povzroči nestabilnost nitastega curka in s tem nastanek posušenih kapljic ter NV z vozli na zbiralu.

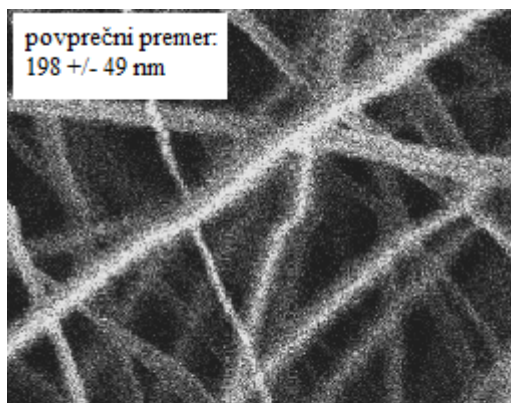
Po drugi strani pa manjša površinska napetost raztopine polimera omogoča izdelavo NV z manj vozli. Pri tem pa je nižja tudi napetost, ki jo moramo pri tem uporabiti (12).



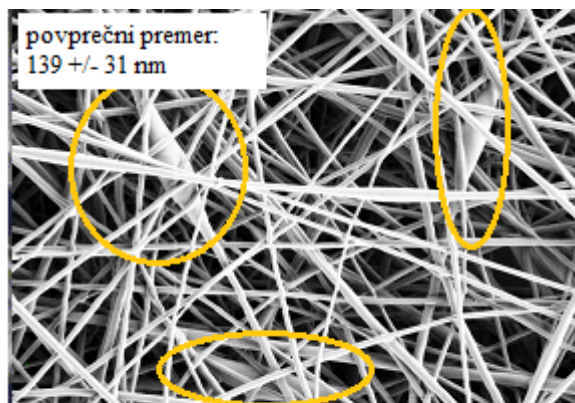
NV iz 8 % PVA .



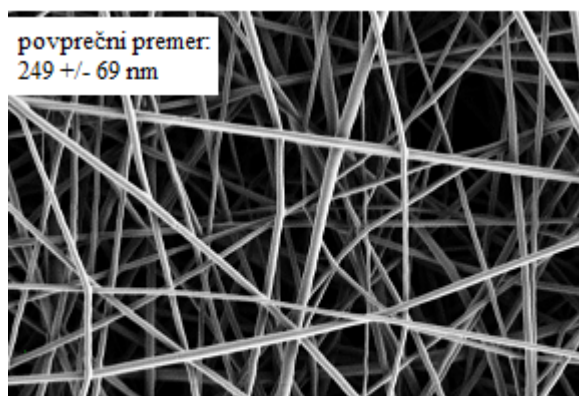
NV iz 8 % PVA in L .
Pojavnost vozlov.



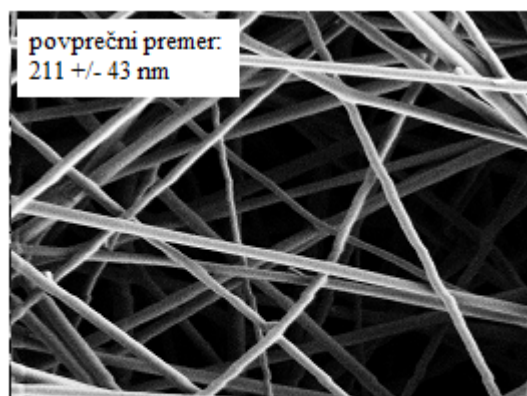
NV iz 9 % PVA .



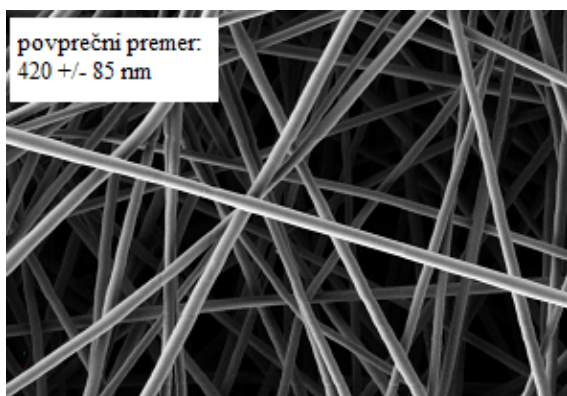
NV iz 9 % PVA in L .
Pojavnost vozlov.



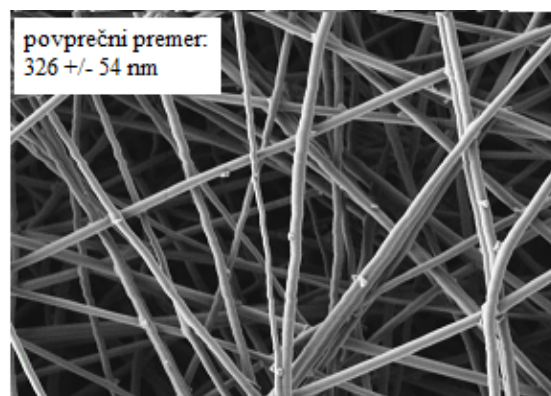
NV iz 10 % PVA .



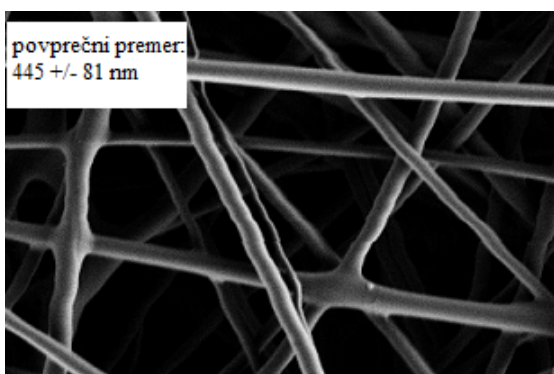
NV iz 10 % PVA in L .
Rašel pojav kristalov L zunaj NV.



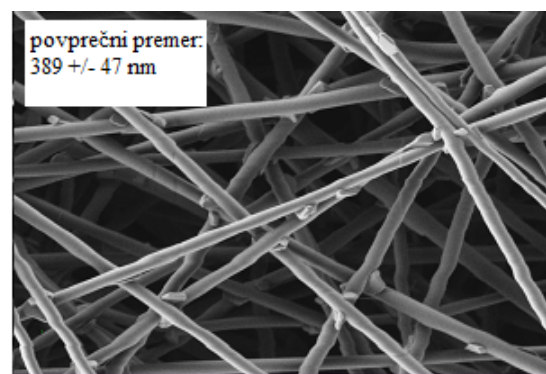
NV iz 11 % PVA.



NV iz 11 % PVA in L.
Pojav kristalov L na zunanji površini NV.



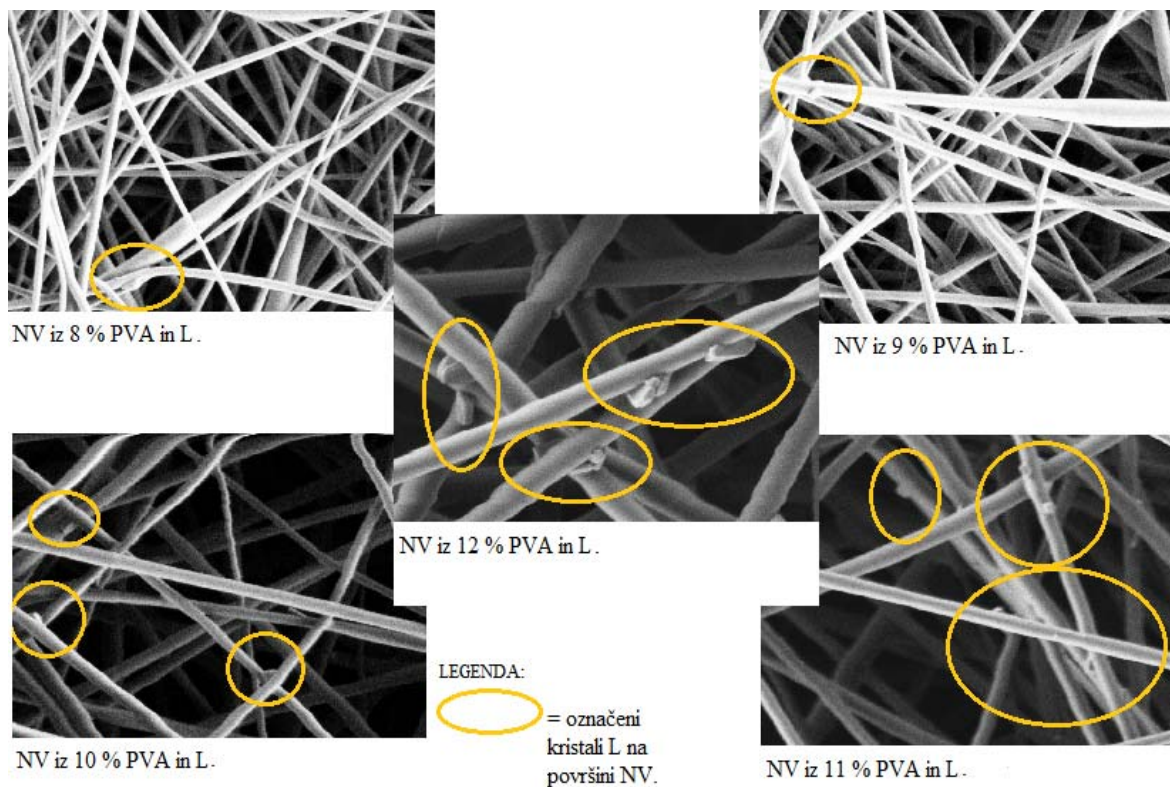
NV iz 12 % PVA.



NV iz 12 % PVA in L.
Pojav kristalov L na zunanji površini NV.

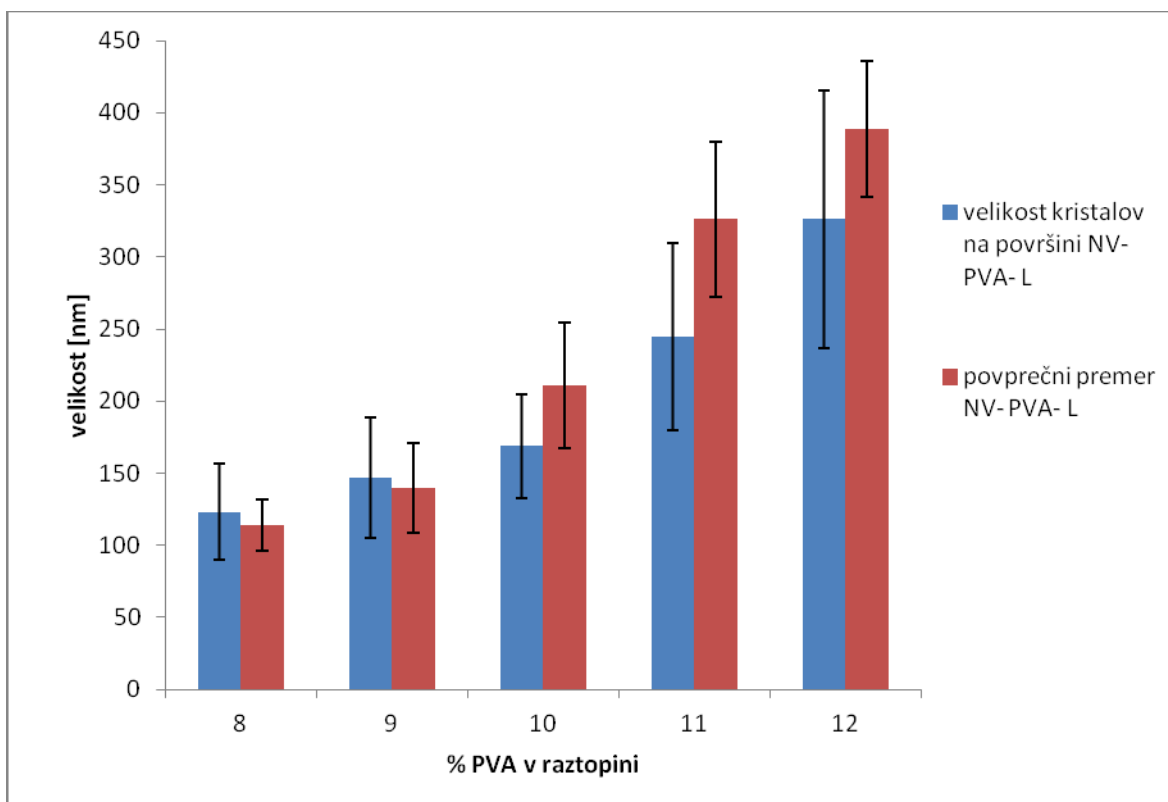
Slika 18: Posnetki SEM NV izdelanih iz 8 do 12 % polimernih raztopin PVA, brez in z vsebnostjo L; povečava: 20.000 x.

Pri analizi posnetkov SEM smo opazili, da vgraditev L v NV ni bila popolna, saj so bili na njihovi površini vidni posamezni delci učinkovine (slika 18 in 19). Kristali L so bili najbolj opazni na NV izdelanih iz raztopin z 11 in 12 % PVA, medtem ko so bili v primerih NV izdelanih iz 8, 9 in 10 % raztopin komaj vidni. Ugotovili smo, da sta velikost in delež kristalov L na površini NV večji, pri večjih koncentracijah raztopine polimera, kar lahko razložimo na sledeč način. Ker se z zviševanjem koncentracije povečuje preplet verig v raztopini PVA, to najverjetneje otežuje vgradnjo L mednje in v nastajajoča NV, zato dobimo na površini NV več kristalov. Podobnih rezultatov nismo zasledili v nobeni literaturi. Res pa je, da je delo tistih raziskovalnih skupin, ki so vgrajevale različne učinkovine v NV iz PVA, temeljilo na manj koncentriranih raztopinah (od 5 do 10 % PVA) in na drugih zdravilnih učinkovinah (7, 19, 20).



Slika 19: Posnetki SEM NV izdelanih iz različno koncentriranih raztopin PVA z dodatkom L; povečava: 50.000 x. Na površini NV so vidni kristali L.

Povprečna velikost kristalov L izraženih na površini NV, izdelanih iz 8 in 9 % raztopine PVA je bila večja od povprečnega premera NV- PVA- L (slika 20). Kljub temu, da je bila velikost kristalov L na površinah NV izdelanih iz 10, 11 in 12 % raztopin PVA manjša od povprečnega premera NV- PVA- L, pa se očitno tudi v tem primeru L ni popolnoma vgradili v NV. Sklepamo lahko torej, da na vgradnjo L vpliva razlika v hitrostih njegove kristalizacije in sušenja polimera med postopkom ES.



Slika 20: Velikost kristalov L, ki se pojavljajo na površini NV in povprečni premeri NV v odvisnosti od koncentracije raztopine PVA z dodanim L. Vsebnost L je v vseh primerih 10%, glede na vsebnost PVA.

4.3.4 Vpliv stabilizacije na povprečni premer in morfologijo izdelanih nanovlaken

Ko smo NV potopili v vodo smo ugotovili, da se v hipu raztopijo. Ta efekt pripisujemo njihovi izredno veliki specifični površini. Zato smo morali za nadaljnje testiranje NV obvezno stabilizirati.

Za ta namen smo izbrali tri različne fizikalne metode, in sicer: namakanje v dveh netopilih (MeOH in EtOH) ter uporabo toplote. Vsi trije načini stabilizacije odtegnejo odvečno vodo iz notranjosti NV, pri čemer se vodikove vezi med vodo in polimerom nadomestijo z intermolekularnimi vodikovimi vezmi med verigami samega polimera. Posledica tega je večji privlak med molekulami PVA in večja stabilnost NV v vodnem mediju (20, 29). Velja še omeniti, da smo fizikalne metode stabilizacije izbrali zato, da smo se izognili uporabi kemijskih premreževalcev, ki lahko zaostanejo v NV in povzročajo neželene učinke.

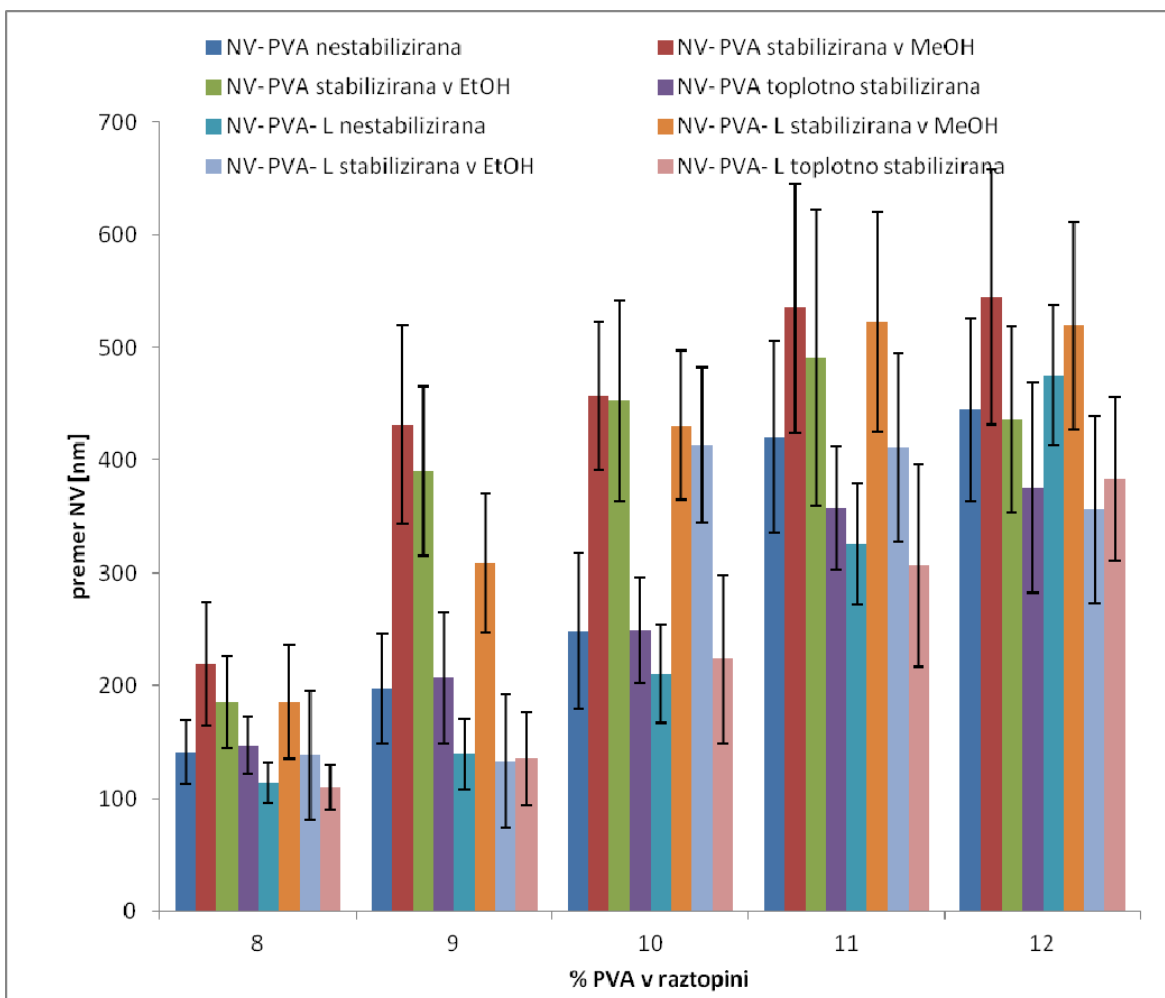
4.3.4.1 Vpliv stabilizacije na premer izdelanih nanovlaken

Slika 21 prikazuje vpliv vrste stabilizacije na premer izdelanih NV. Rezultati kažejo, da vsi trije načini stabilizacije do določene mere zagotavljajo ohranitev fibrilarne strukture NV, vendar pa lahko vplivajo na njihov premer.

Ugotovili smo, da je največjo spremembo povprečnega premera NV povzročila stabilizacija z MeOH, in sicer pri vseh uporabljenih koncentracijah PVA tako pri NV brez in tudi z dodatkom L. Povprečno povečanje premera v primeru NV- PVA je bilo 147 nm, v primeru NV- PVA- L pa 158 nm. Največjo spremembo med nestabiliziranimi in stabiliziranimi NV, smo opazili pri NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA, in sicer tako pri tistih brez kot z L, in to kljub temu, da sta se viskoznost in prevodnost raztopine s to isto koncentracijo najmanj razlikovali pred in po dodatku L. Povečanje premera izdelanih NV je najverjetneje posledica nabrekanja PVA v MeOH (29).

Stabilizacija v EtOH je v večini primerov tudi nekoliko povečala povprečni premer izdelanih NV (slika 21), vendar pa manj, kot v primeru uporabe MeOH. Pri NV izdelanih iz 12 % raztopine PVA brez in z dodatkom L pa je po obdelavi z EtOH premer ostal nespremenjen. Sklepamo torej lahko, da PVA nabreka tudi v EtOH, vendar pa manj kot v MeOH.

Obdelava NV s toploto ni bistveno vplivala na njihove povprečne premere in so po stabilizaciji ostali znotraj standardnih deviacij meritev premerov nestabiliziranih vlaken.

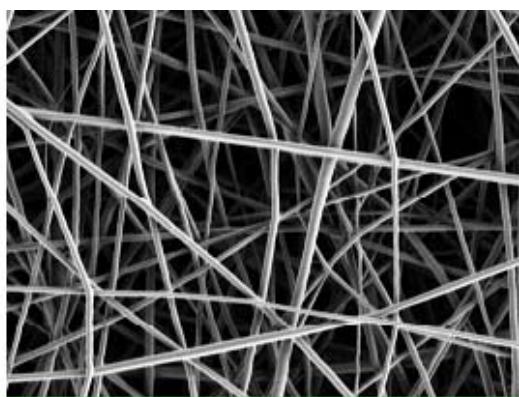


Slika 21: Sprememba povprečnih premerov NV glede na vrsto stabilizacije in glede na koncentracijo PVA v raztopinah iz katerih so bila NV izdelana. Vsebnost L je v vseh primerih 10 %, glede na vsebnost PVA.

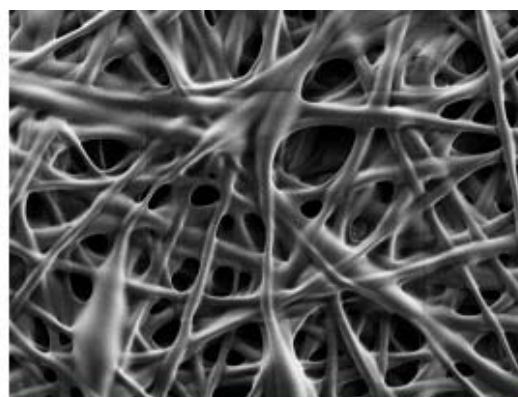
4.3.4.2 Vpliv stabilizacije na morfologijo izdelanih nanovlaken

Način stabilizacije ima velik vpliv tudi na morfologijo izdelanih NV, pri čemer smo ne glede na uporabljeno koncentracijo polimera opazili enak trend, ki ga prikazuje slika 22. Vidimo, da povzroči obdelava NV- PVA z MeOH rahlo spremembo morfologije, pri čemer pa se njihova fibrilarna struktura vseeno ohrani. Kot smo že omenili, NV- PVA namreč v MeOH rahlo nabrekajo, pri tem pa niso več gladkih in okroglih oblik, nekatera pa so celo zlita skupaj. Podobne morfološke spremembe smo opazili tudi pri NV, stabiliziranih z EtOH, le da so bile v tem primeru spremembe še večje, saj so NV še v večjem obsegu izgubila svojo značilno obliko, poleg tega pa jih je bilo še več zlitih skupaj. Toplotna

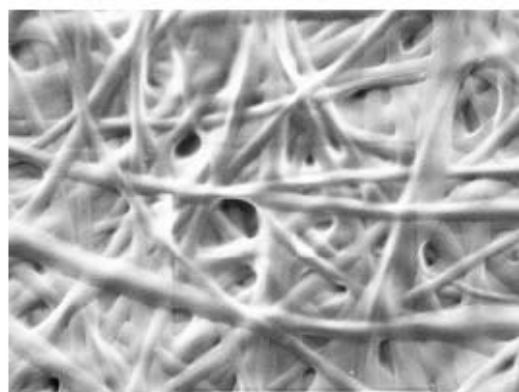
obdelava NV pa na pogled ni imela vpliva na morfologijo in izgled NV, saj so ta ohranila svojo značilno okroglo obliko in so ostala gladka.



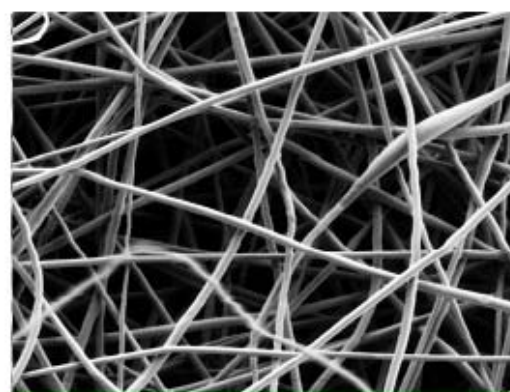
Nestabilizirana NV. Povprečni premer: 249 +/- 69 nm



NV stabilizirana v MeOH. Povprečni premer: 457 +/- 66 nm.



NV stabilizirana v EtOH. Povprečni premer: 453 +/- 89 nm.

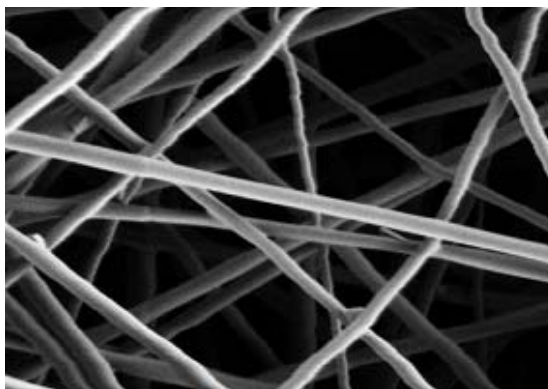


Toplotno stabilizirana NV.
Povprečni premer: 249 +/- 47 nm.

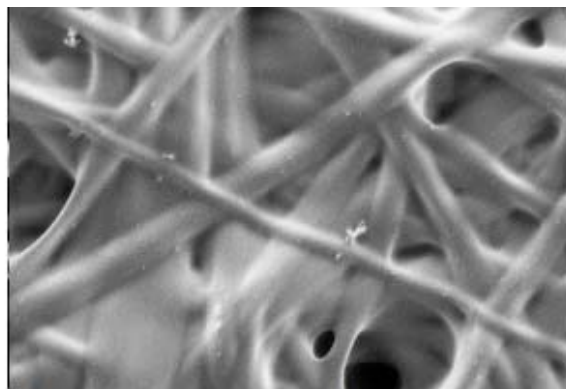
Slika 22: Posnetki SEM NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA. Nestabilizirana NV in izpostavljena različnim načinom stabilizacije; povečava: 20.000 x.

Enake slike smo opazili tudi v primeru NV z vgrajenim L (slika 23), pri čemer pa je EtOH vplival tudi na vgrajeni L. Če primerjamo z EtOH stabilizirana NV- PVA- L z nestabiliziranimi opazimo, da na površini prvih NV ni več vidnih kristalov L, se pa zato pojavijo mnogo manjši, ki so ujeti v steno NV (slika 23). Sklepamo, da EtOH na nek način vpliva na L in na njegovo vgrajevanje, zato ni več vidnih kristalov na površini NV. Ugotovimo lahko tudi, da toplotna obdelava poveča število kristalov L na površini NV, pri čemer pa je njihova velikost v povprečju enaka ali nekaj večja od kristalov, ki so prisotni na površini nestabiliziranih NV. Menimo, da toplotna obdelava NV najverjetneje vpliva na

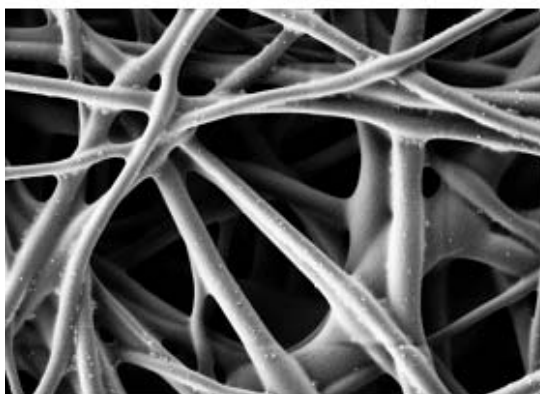
sam PVA, in sicer tako da, poveča število in velikost por na NV, skozi katere lahko noter uhaja zdravilna učinkovina L.



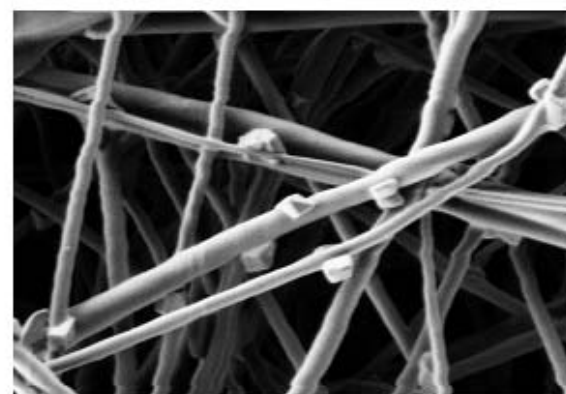
Nestabilizirana NV z L.
Povprečni premer: 211 +/- 43 nm.



NV z L stabilizirana v MeOH.
Povprečni premer: 431 +/- 66 nm.



NV z L stabilizirana v EtOH.
Povprečni premer: 414 +/- 69 nm.



Toplotno stabilizirana NV z L.
Povprečni premer: 224 +/- 75 nm.

Slika 23: Posnetki SEM NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA z vgrajenim L. Nestabilizirana NV in izpostavljena različnim načinom stabilizacije; povečava: 50.000 x.

Na prvi pogled bi iz dobljenih rezultatov lahko zaključili, da je najprimernejša metoda stabilizacije NV iz PVA uporaba toplote, saj sta se v tem primeru še najmanj spremenila morfologija in povprečni premer vlaken. Ko pa želimo v takšna NV vgraditi zdravilno učinkovino, se izkaže, da ta metoda stabilizacije ni optimalna, ker v tem primeru poveča delež zdravilne učinkovine L na površini NV. Zato je bila v našem primeru od vseh treh uporabljenih še najboljša stabilizacija NV iz PVA z L z MeOH. Ta ima sicer velik vpliv na spremembo povprečnega premera in morfologijo tovrstnih NV, vendar pa ne vpliva na vgrajeno učinkovino L.

4.4 HIDRATACIJA IN EROZIJA IZDELANIH NANOVLAKEN

Hidratacija je po definiciji proces vezave molekul vode na material (polimer) s šibkimi molekulskimi vezmi (27). Razgradnja materiala pomeni kemijsko cepitev vezi in je za večino umetnih biorazgradljivih polimerov, kamor sodi tudi PVA, posledica pasivne hidrolize. Erozijski proces polimera je izredno zahteven fizikalni proces raztapljanja, odpletanja, razgradnje in difuzije polimernih verig s površine ogrodja. Ponavadi pri tem sočasno potekajo tako fizikalni kot kemijski procesi razgradnje, ki pa jih največkrat označujejo kar z izrazom erozija (30).

Vrednotenje hidratacije in erozije NV iz PVA je bilo zelo težavno, saj so bile količine vzorcev, s katerimi smo delali poizkuse izredno majhne (povprečna masa NV na krovnih stekelcih je bila od 0,5 do 1 mg). Zaradi dela s tako majhnimi vzorci in številnih tehničnih dejavnikov je ta metoda, čeprav se tudi v drugih študijah najpogosteje uporablja, nenatančna, kar smo morali upoštevati pri obravnavi rezultatov.

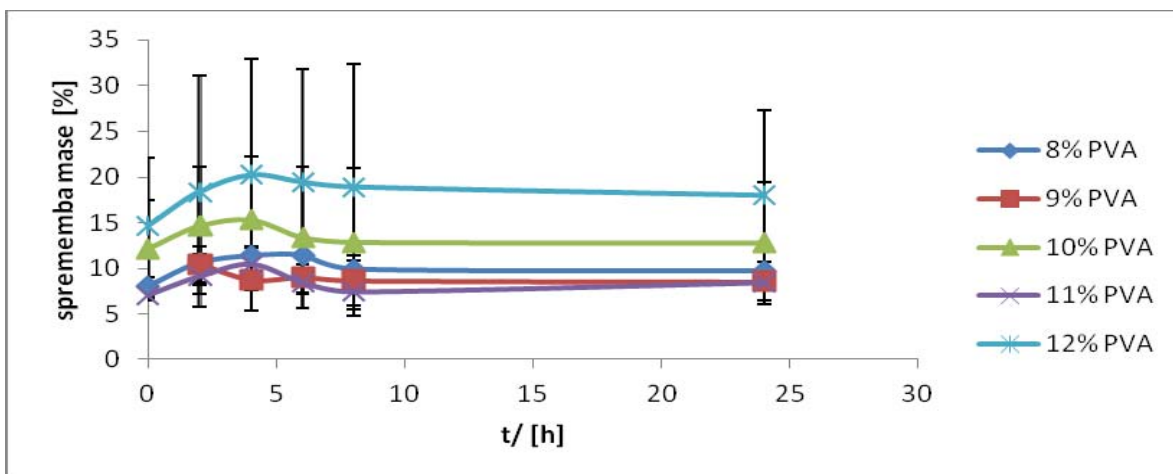
V naših meritvah smo hidratacijo NV opredelili do tiste točke, ko je masa vzorca naraščala in dosegla najvišjo vrednost. Kasneje, ko je prišlo do zmanjšanja mase, pa smo sklepali, da že poteka erozija. Zavedamo se, da tako v prvi kot v drugi stopnji sočasno potekata oba procesa, vendar pa pri tem eden izmed njiju vsakič prevladuje. Rezultate smo tako izrazili kot delež spremenjene mase NV glede na začetno maso vzorca. Pri nekaterih vzorcih smo proti koncu postopka, ko so predhodne meritve že kazale na erozijo, še izmerili višje mase, vendar pa smo pri končni obravnavi rezultatov to pripisali nenatančnosti metode in zato tovrstne izsledke zavrgli, saj najverjetneje iz takih vzorcev ni bila v celoti odstranjena nevezana voda.

Slika 24 prikazuje rezultate meritev hidratacije NV stabiliziranih v MeOH. Ugotovili smo, da je hidratacija NV izdelanih iz 8 in 9, 10 in 11 % raztopine polimera potekala v fosfatnem pufru s pH 7,4 do četrte ure, nato pa se je masa vzorca začela zmanjševati zato smo predvidevali, da je že prišlo do erozije oziroma da je ta proces prevladal. Mase teh vzorcev tudi po petih dnevih niso bile manjše od tistih, ki smo jih izmerili na začetku, kar pomeni, da NV v tem časovnem intervalu še vedno niso popolnoma razpadla. Hidratacija NV izdelanih iz 12 % PVA je potekala dve uri več (6 ur) kot pri tistih izdelanih iz manj koncentriranih raztopin polimera, nato pa smo po osmih urah že zaznali zmanjšanje mase in sklepali, da je prišlo do erozije. Menimo, da so navedeni rezultati logični. Hidratacija

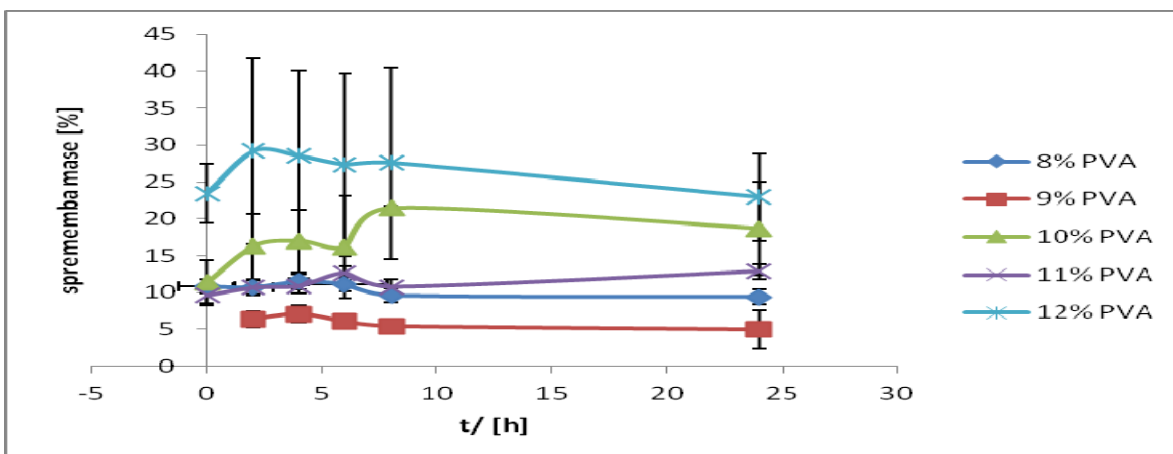
namreč poteka dalj časa pri tistih NV, ki so izdelana iz bolj koncentriranih raztopin, ker le te vsebujejo več PVA, kamor se lahko veže več in dalj časa molekul vode. Tudi v teh primerih mase vzorcev NV po petem dnevu merjenja niso bile manjše od začetnih.

Slika 25 prikazuje spremembe mase pri ugotavljanju stopnje hidratacije NV stabiliziranih v EtOH. Ugotovili smo, da so se v fosfatnem pufru najdlje hidratirala NV izdelana iz 11 % raztopine PVA, in sicer šest ur. Štiri ure so se hidratirala NV pripravljena iz 8, 9, 10 in 12 % raztopine polimera, po šestih urah pa smo že zaznali njihovo erozijo. Če primerjamo te rezultate z rezultati po uporabi MeOH opazimo, da je hidratacija NV izdelanih iz 8, 9, 10 in 11% raztopine PVA enaka v obeh netopilih. Spremembe smo zaznali le pri NV, izdelanih iz 12 % raztopine PVA, pri katerih je bila hidratacija v EtOH, v primerjavi z MeOH krajša za dve uri. Krajši čas hidratacije NV pripravljenih iz bolj koncentriranih raztopin PVA bi lahko pripisali delni topnosti samega polimera v EtOH (18). PVA v EtOH namreč dokazano veže molekule vode in hidratira, vendar pa se pri tem delno raztaplja, zato bi morali načeloma izmeriti krajši čas hidratacije pri NV iz vseh koncentracij polimernih raztopin, kot v MeOH. Z našimi rezultati tega nismo potrdili pri vseh koncentracijah, kar lahko pripišemo nenatančnosti metode.

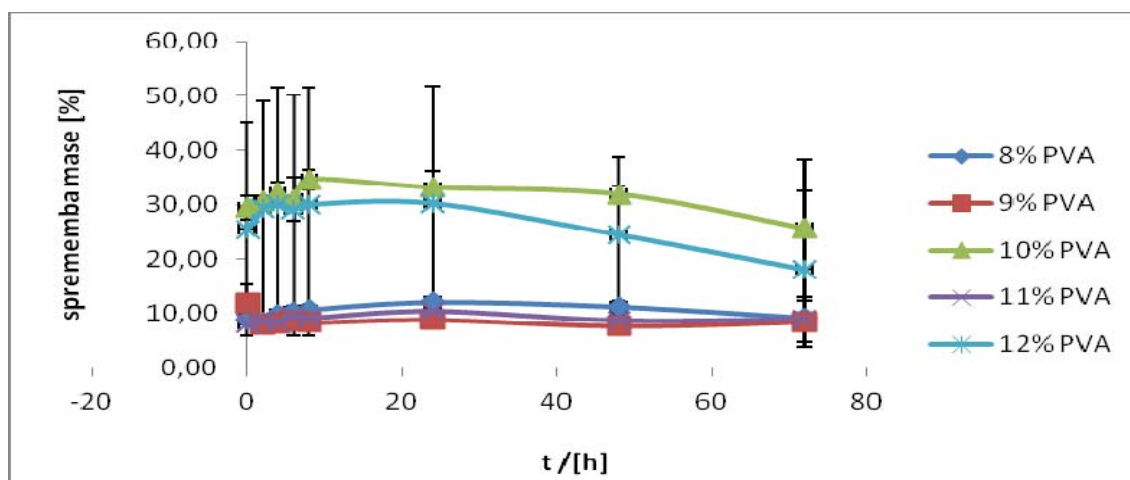
Slika 26 prikazuje NV stabilizirana s toploto. Ta so hidratirala kar 24 h in šele nato se je pričela njihova erozija.



Slika 24: Sprememba mase NV stabiliziranih z MeOH, v odvisnosti od časa, v poskusih spreminjanja njihove hidratacije in erozije v fosfatnem pufru s pH 7, 4.



Slika 25: Sprememba mase NV stabiliziranih z EtOH, v odvisnosti od časa, pri poskusih spremljanja hidratacije in erozije v fosfatnem pufru s pH 7, 4.



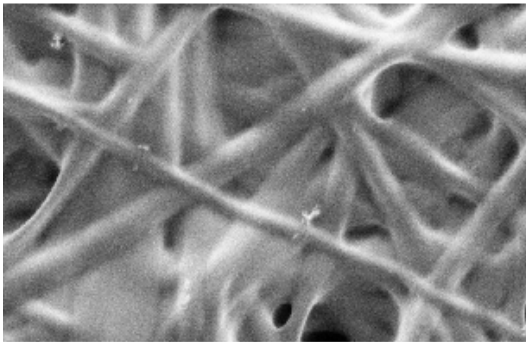
Slika 26: Sprememba mase toplotno stabiliziranih NV, v odvisnosti od časa, pri poskusih spremljanja hidratacije in erozije v fosfatnem pufru s pH 7, 4.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da način stabilizacije vpliva na trajanje hidratacije in pričetek erozije NV iz PVA, pri čemer je najdalj trajala hidratacija oziroma se je najkasneje začela erozija pri tistih, ki smo jih stabilizirali s toploto. Pri NV, ki smo jih stabilizirali v MeOH in EtOH pa se je erozija začela že po nekaj urah. Obdelava s toploto je torej najbolje stabilizirala NV in jih zaščitila pred razgradnjo. Najverjetneje je to posledica dejstva, da ob izpostavitvi visoki temperaturi (160 °C) iz NV bolj učinkovito odstranimo vodo, s tem pa je omogočena tvorba večjega števila vodikovih vezi med polimernimi verigami kar zagotavlja večjo kristaliničnost.

4.4.1 Vpliv hidratacije in erozije na morfologijo izdelanih nanovlaken

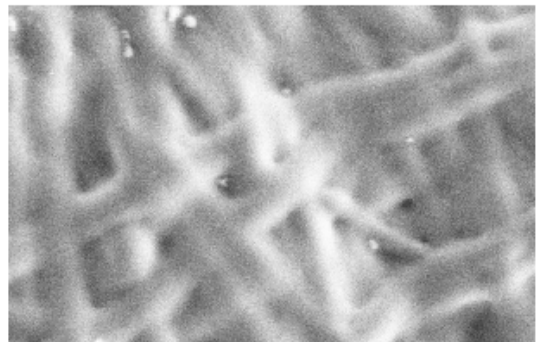
Po petih dnevih v fosfatnem pufru s pH 7, 4 smo vzorce NV, izdelanih iz 10 % raztopine PVA pregledali še s SEM, saj nas je zanimalo ali se ohrani fibrilarna struktura NV. Odločili smo se za pregled NV izdelanih le iz ene koncentracije polimera 10 % PVA, saj smo glede na prejšnje rezultate predvidevali, da bo trend morfoloških sprememb enak pri vseh koncentracijah. Iz slike 27, ki prikazuje izgled NV pred in po hidrataciji je razvidno, da se ohrani njihova celotna morfologija, saj so posamezna vlakna še vedno vidna. Opazili smo tudi, da namakanje v fosfatnem pufru s pH 7, 4 pri toplotno stabiliziranih NV povzroči, da ta niso več razporejena posamično, saj se tvorijo snopi vlaken.

Pred metodo hidratacije in erozije:



NV iz 10 % PVA stabilizirana v MeOH.

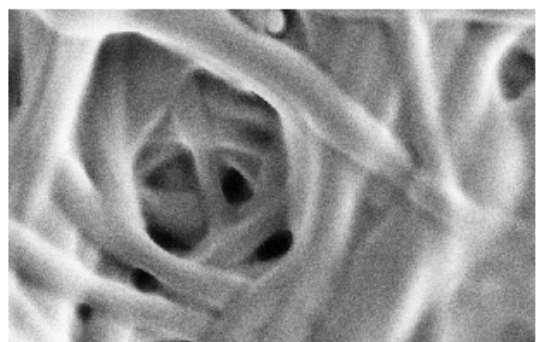
Po metodi hidratacije in erozije:



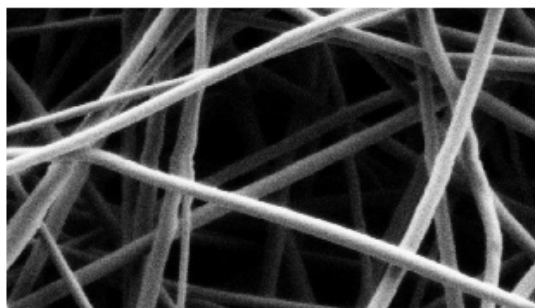
NV iz 10 % PVA stabilizirana v MeOH.



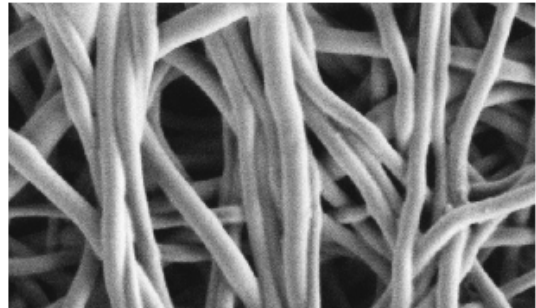
NV iz 10 % PVA stabilizirana v EtOH.



NV iz 10 % PVA stabilizirana v EtOH.



NV iz 10 % PVA toplotno stabilizirana.



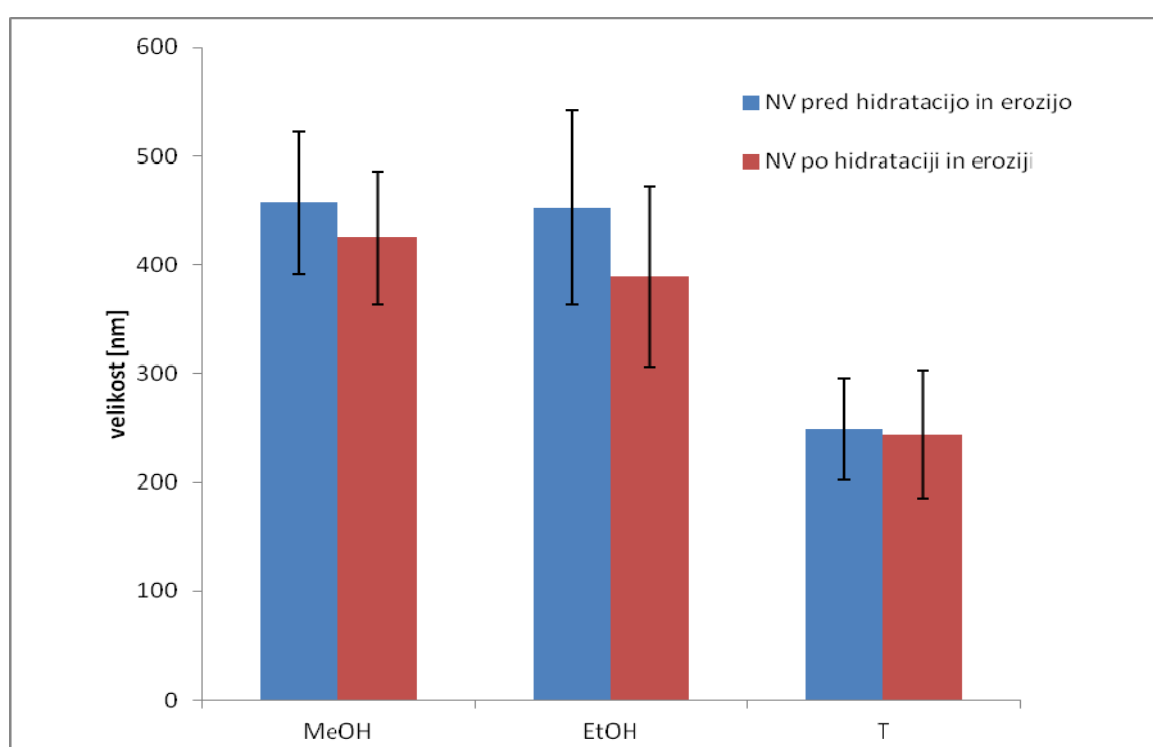
NV iz 10 % PVA toplotno stabilizirana.

Slika 27: Posnetki SEM NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA: na levi so prikazana NV stabilizirana z vsemi tremi postopki stabilizacije, pred namakanjem v fosfatnem pufru s pH 7, 4, na desni pa po petih dnevih namakanja; povečava: 50. 000 x.

4.4.2 Vpliv hidratacije in erozije na povprečni premer izdelanih nanovlaken

Slika 28 prikazuje povprečne premere NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA in sicer pred in po postopku določanja hidratacije in erozije. Opazimo lahko, da se premeri niso bistveno

spremenili. Povprečni premer NV stabiliziranih v MeOH in EtOH se je nekoliko zmanjšal, pri tistih, ki so bila toplotno stabilizirana pa ostal nespremenjen. Ti rezultati so v skladu z rezultati hidratacije in erozije, kjer smo dokazali, da hidratacija NV, stabiliziranih v MeOH in EtOH poteka krajši čas kot, v primeru njihove predhodne toplotne stabilizacije. Pri NV stabiliziranih s toploto očitno erozija poteka zelo počasi. Ker pa ta vlakna poleg tega še najdlje nabrekajo, so bili njihovi premeri po petih dnevih namakanja v fosfatnem pufru še vedno enake velikosti kot na začetku. Zaključimo torej lahko, da je postopek, s katerim najučinkovitejše stabiliziramo NV iz PVA pred razgradnjo v fiziološkem okolju, toplotna stabilizacija.



Slika 28: Velikost povprečnih premerov NV izdelanih iz 10 % PVA stabiliziranih z vsemi tremi načini, pred in po 5 dnevem namakanju NV v fosfatnem pufru s pH 7, 4 (n= 50).

4.5 SPROŠČANJE LEVOFLOKSACINA IZ NANOVLAKEN

4.5.1 Vrednotenje čistote in stabilnosti levofloksacina

Levofloksacin (L), ki smo ga uporabljali pri našem delu, je bil shranjen na UL Fakulteti za farmacijo že od leta 2002, zato nas je pred začetkom eksperimentov zanimala njegova

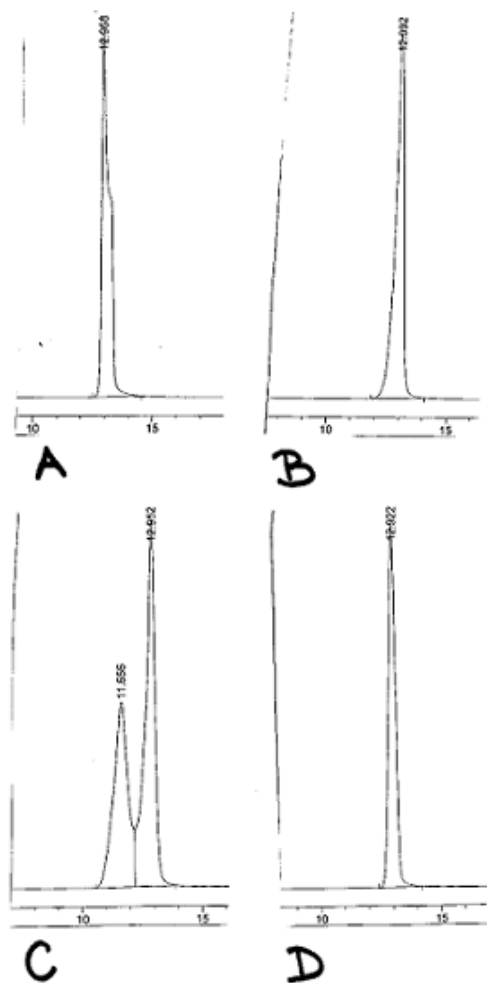
čistota. V teh letih bi namreč kljub pravilnemu shranjevanju lahko prišlo do nastanka razgradnih produktov oziroma nečistot. Prav tako nas je zanimala tudi njegova stabilnost v fosfatnem pufru s pH 7,4, v MeOH in EtOH ter pri povišani temperaturi.

Stabilnost L v fosfatnem pufru smo dokazali spektrofotometrično in sicer pri valovni dolžini 287 nm, kjer smo v različnih časovnih intervalih merili isto raztopino z znano koncentracijo. Iz tabele V je razvidno, da se absorbanca L tudi po petih dnevih merjenja ne spremeni, zato smo sklepali, da je L v fosfatnem pufru stabilen. Seveda pa iz teh podatkov o sami čistoti L z gotovostjo nismo mogli sklepati, saj s to analitsko metodo skupaj z učinkovino določamo tudi tiste razgradne produkte in nečistote, ki jih lahko zaznamo z UV detektorjem.

Tabela V: Meritve absorbanca L v fosfatnem pufru, 2 uri po pripravi raztopine, po enem in po petih dnevih.

t/ [h]	Absorbanca
2	0,735 +/- 0,0042
24	0,736 +/- 0,0003
120	0,736 +/- 0,0038

Čistoto L v fosfatnem pufru in njegovo stabilnost v MeOH, EtOH ter pri povišani temperaturi smo določili z metodo HPLC, ki je, glede na podatke iz literature, ustreza metoda za ločevanje in zaznavo najpogostejših razgradnih produktov (22). Pripravili smo znane koncentracije raztopin L v fosfatnem pufru, MeOH, EtOH in raztopino L, ki smo ga predhodno sušili 10 min na 160 °C v topilu acetonitril: voda (40: 60) ter jih analizirali. Slika 29 prikazuje vzorčne kromatograme. S postopkom HPLC smo ponovno potrdili stabilnost L v fosfatnem pufru, saj je na kromatogramu jasno viden en kromatografski vrh z retencijskim časom 12,9 min. Ker ni bilo prisotnih nobenih drugih vrhov, smo upravičeno sklepali, da je analizirani L čist. Ugotovili smo tudi, da je L stabilen v MeOH in pri povišani temperaturi, saj smo tudi v teh vzorcih dokazali le po en kromatografski vrh z retencijskim časom 12,9 min. Pri merjenju raztopine L v EtOH pa sta bila na kromatogramu dva vrhova z retencijskima časoma 11,7 in 12,9 min (slika 29). Zato smo sklepali, da prisotnost EtOH povzroči spremembo učinkovine. Krajši retencijski čas pri uporabi izključitvene kolone, ki smo jo uporabili v našem primeru pomeni, da je



Slika 29: Prikaz retencijskih vrhov na kromatogramu HPLC. A: L v fosfatnem pufru s pH 7, 4; B: L v MeOH; C: L v EtOH- pojav dveh kromatografskih vrhov; D: L, ki smo ga predhodno sušili na 160 °C in nato raztopili v topilu acetonitril: voda (40: 60).

Iz dobljenih rezultatov smo tako zaključili, da je bila naša analizirana zdravilna učinkovina L čista in stabilna v fosfatnem pufru, MeOH ter pri povišani temperaturi. Hkrati pa smo s tem potrdili tudi naša opažanja iz prejšnjega poglavja 4. 3. 4. 2. (Vpliv stabilizacije na morfologijo izdelanih NV), ko smo pri pregledovanju posnetkov SEM NV- PVA- L, ki smo jih stabilizirali v EtOH ugotovili, da ta vpliva na L. Pri tem smo tudi opazili, da se poveča delež prisotnega L na zunanji površini NV, ki smo jih toplotno stabiliziramo. S postopkom HPLC pa smo dokazali, da temperatura ne povzroči nikakršnih sprememb L. Temperaturna stabilizacija je torej vplivala le na PVA iz katerega so bila NV izdelana, in

sicer, kot smo že omenili tako da, je povečala poroznost NV, zato smo na njihovi površini zaznali več L.

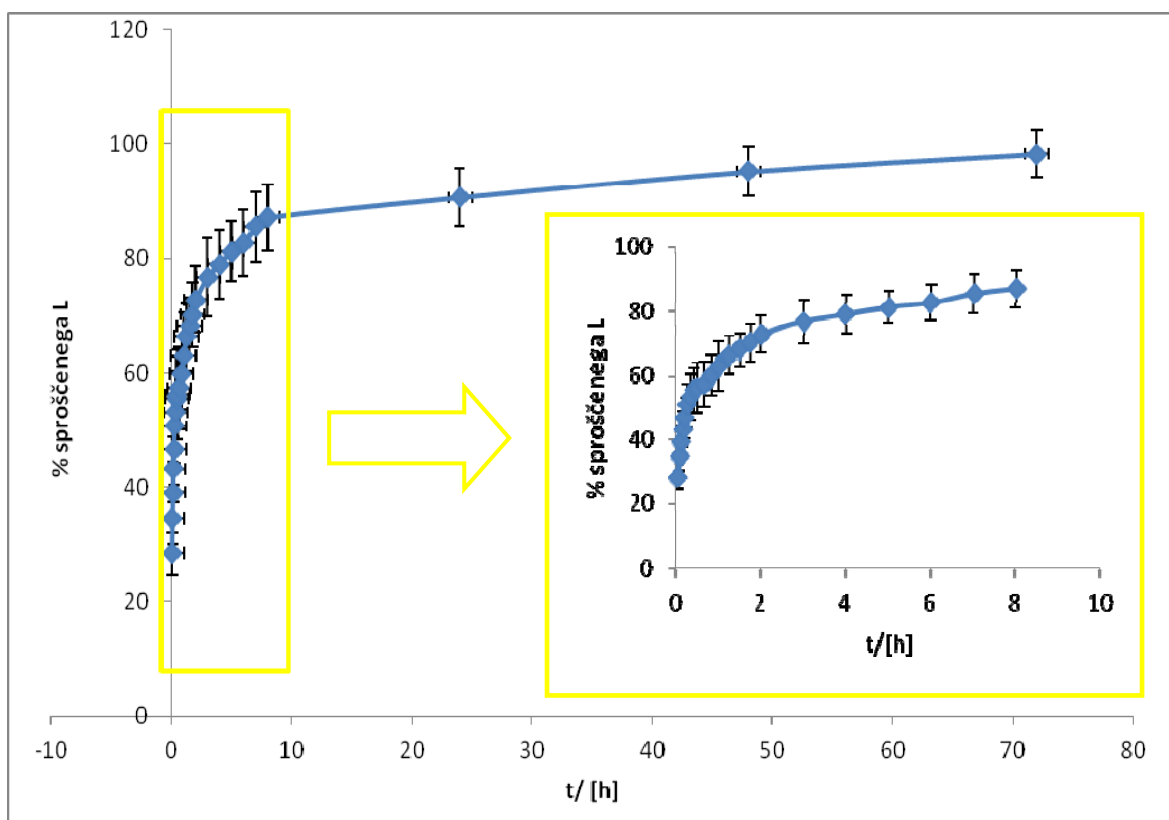
4.5.2 Sproščanje levofloksacina iz izdelanih nanovlaken

Ker smo med našim raziskovalnim delom ugotovili, da so bile najmanjše spremembe lastnosti raztopine polimera in morfologije iz nje izdelanih NV z in brez vgrajenega L prisotne pri 10 % raztopini PVA, ki je predstavljala tudi srednjo vrednost uporabljenih koncentracij in nam omogočila izdelavo gladkih NV, smo se odločili, da tovrstna vlakna uporabimo za preučevanje sproščanja L. Ugotovili smo tudi, da NV, stabilizirana z EtOH zaradi njihovega vpliva na L niso bila primerna za proučevanje sproščanja omenjene učinkovine. Smo to preučili le na NV izdelanih iz 10 % PVA stabiliziranih z MeOH (optimalna stabilizacija za NV- PVA- L) in s toploto.

4.5.2.1 Sproščanje levofloksacina iz nanovlaken stabiliziranih z metanolom

Preskuse sproščanja L smo vedno izvajali v treh paralelkah, in sicer tako, da smo imeli vzorce NV, ki smo jih pripravili iz 10 % raztopine PVA in dodanim L (10 % m/ m L) nanešene na krovnih stekelcih. Vsebnost L v suhih NV bi teoretično tako morala dejansko ustrezati 10 % mase vzorca (NV na krovnem stekelcu). Pri pregledu podatkov iz literature pa smo ugotovili, da lahko pride do izgube v NV vgrajene zdravilne učinkovine po izpostavitvi vlaken MeOH, saj lahko zdravilna učinkovina difundira skozi pore NV in se raztopi (20). Poleg tega smo na posnetkih SEM videli, da se ves L ne vgradi v NV. Prav zaradi tega, smo morali za pravilen izračun deležev sproščenega L najprej ugotoviti, kakšna je dejanska vsebnost L v suhih NV po njihovi stabilizaciji. To smo naredili tako, da smo v vzorcih, ki smo jih uporabili za sproščanje, po sedmih dnevih pomerili vsebnost L in predpostavili, da se v tem času sprosti celotna količina vgrajenega L. Iz tega podatka smo nato preračunali delež sproščenega L v odvisnosti od časa, s pomočjo enačbe umeritvene premice ($y = 65305x - 1,6128$; $x =$ koncentracija L v mg/ ml; $y =$ površina pod kromatografskim vrhom). Ugotovili smo, da se je v povprečju v in na NV vgradilo le 4 +/- 2 % celotne količine L, ki smo jo dodali v raztopino.

Slika 30 prikazuje profil sproščanja L iz NV stabiliziranih z MeOH. Vidimo lahko, da se je polovica v NV vgrajenega L sprostila že po 15 minutah, po šestih urah se je sprostilo okoli 80 % L, po petih dnevih sproščanja pa 98 % L. Dobljeni rezultati so v skladu s tistimi, ki smo jih dobili pri ugotavljanju hidratacije teh istih NV, ki so hidratirala do 6 ur v fosfatnem pufru, pri čemer so se polimerne verige začele odpletati, kar se je kazalo v izgubi mase, povečale so se pore, difuzija učinkovine skozi nastali medij pa je bila olajšana, zato se je največ učinkovine sprostilo ravno v tem času.



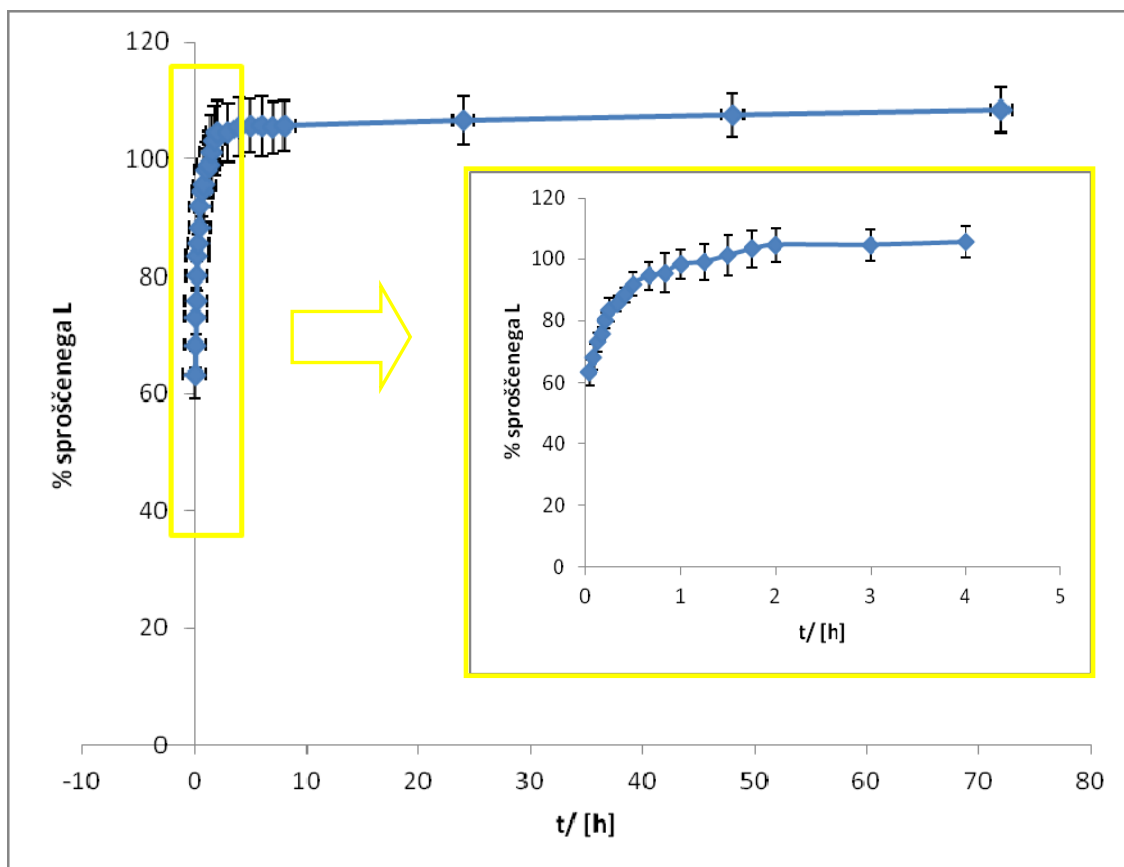
Slika 30: Sproščanje L iz v MeOH stabiliziranih NV, izdelanih iz 10 % PVA v odvisnosti od časa.

4.5.2.2 Sproščanje levofloksacina iz toplotno stabiliziranih nanovlaken

Ugotovili smo, da pride pri toplotni stabilizaciji NV do povečanja njihove poroznosti, na njihovi površini pa se poveča tudi število kristalov L. Zato smo pri ugotavljanju sproščanja L iz toplotno stabiliziranih NV zaznali tako sproščen delež vgrajene zdravilne učinkovine, pa tudi tistega, ki je bil vezan na površini NV. Postopek vrednotenja pa je bil enak, kot pri NV stabiliziranih z MeOH. Tudi v tem primeru smo ugotovili, da končna količina L (tista

ki se je sprostil v 7 dneh), ki smo jo preračunali za vsak vzorec posebej, ni bila enaka dejanski masi, ki smo jo dodali v raztopino polimera. V povprečju so NV po toplotni stabilizaciji vsebovala $37 \pm 18\%$ L, glede na začetno količino, ki smo jo dodali v raztopino PVA. Z nobeno od uporabljenih metod pa nismo mogli določiti koliko L je bilo dejansko vgrajenega v in koliko na površini NV.

Slika 31 prikazuje profil sproščanja L iz toplotno stabiliziranih NV. Vidimo, da se je že takoj na začetku sprostil okoli 60% L, kar je dvakrat več kot v primeru NV stabiliziranih z MeOH. Po pol ure pa se je sprostil že 90% L, po 90 minutah pa vseh 100% . Tako hiter porast količine sproščenega L lahko pripišemo visoki poroznosti NV, ki se je povečala zaradi stabilizacije NV s toploto. Še pomembneje pri tem pa je, da je bil del L prisoten tudi na površini NV in se je zato ob dodanem fosfatnem pufru takoj raztopil.



Slika 31: Sproščanje L iz toplotno stabiliziranih NV, pripravljenih iz 10% PVA v odvisnosti od časa.

Sproščanje zdravilne učinkovine L iz NV izdelanih iz PVA je odvisno od načina fizikalne stabilizacije NV. Kot najprimernejša se je pokazala stabilizacija v MeOH, saj ta ne vpliva

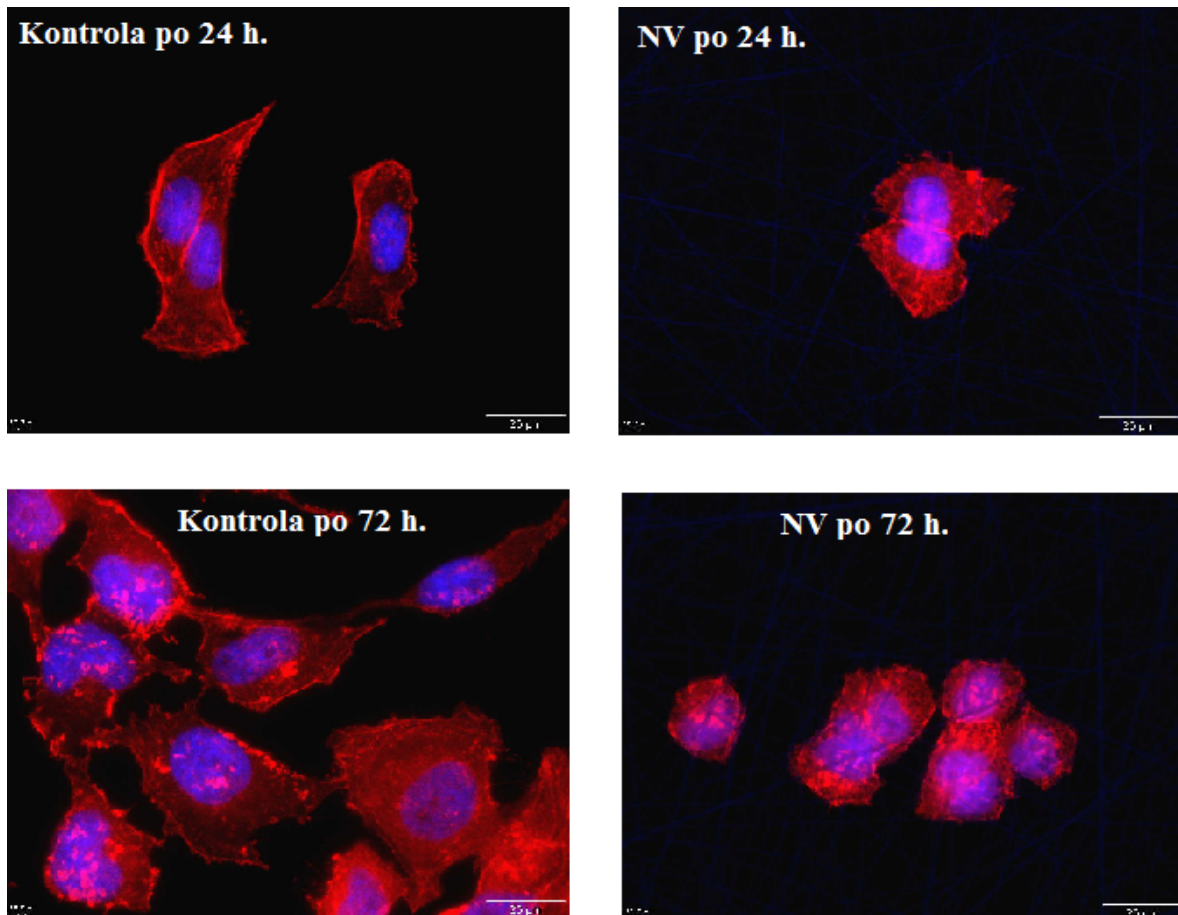
na poroznost NV in na pojav kristalov L na njihovi površini. Ugotovljena profila sproščanja L iz NV nakazuje hiter začetni porast zdravilne učinkovine (t.i. »burst« efekt), pri čemer smo spoznali, da je učinkovitost njegove vgradnje izredno nizka. Tako se tudi pri NV nismo izognili omenjenima dvema najpogostejšim težavam, ki jih tudi sicer srečujemo pri vgradnji učinkovin v konvencionalne dostavne sisteme. Zato bo potrebna še nadaljnja optimizacija tovrstnih NV, na primer s spreminjanjem deleža zdravilne učinkovine, z drugačno pripravo vzorcev, itn. Naj pa na tem mestu tudi omenimo, da morda naša študija sproščanja ni bila najbolj optimalna. Predpostavili smo namreč, da se po sedmih dneh iz NV sprosti celotna količina L ter da je debelina vseh preiskovanih vzorcev enaka, kar naj bi dosegli z enaki časom priprave NV s postopkom ES. Nekateri raziskovalci so namreč odkrili, da je hitrost sproščanja zdravilne učinkovine odvisna tudi od debeline vzorca NV, pri čemer je sproščanje podaljšano v primeru debelejših vzorcev, saj več plasti otežuje difuzijo zdravilne učinkovine v medij (19).

4.6 BIOLOŠKI ODZIV KERATINOCITOV NA PODLAGO IZ NANOVLAKEN *IN VITRO*

Ker je končni cilj raziskovanja NV iz PVA z vgrajenim L, usmerjen v izdelavo sodobne obloge za celjenje ran, nas je zanimalo tudi, kako se keratinociti odzivajo predvsem na nanotopografijo tovrstne rastne podlage. V ta namen smo izbrali najboljša in najstabilnejša NV ob predpostavki, da bi se celice enako obnašale tudi pri ostalih vzorcih. Uporabili smo NV izdelana iz 10 % raztopine PVA, ki smo jih predhodno toplotno stabilizirali, nato pa nanje nanесли keratinocite (postopek je natančno opisan v poglavju 3. 2. 3. Postopki in metode) in vzorce opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom.

Slika 32 prikazuje celice pod fluorescenčnim mikroskopom, katerih jedra so obarvana modro, aktinski filament, ki predstavljajo strukturo citoskeleta, pa rdeče. Vidimo, da so razlike med kontrolami, ki jih predstavljajo celice gojene na golih krovnih stekelcih, in tistimi, ki rastejo na NV, zelo očitne. Tisti keratinociti, ki smo jih gojili na NV, so v primerjavi s kontrolo spremenili obliko iz vretenaste v okroglasto. Okroglo obliko celic lahko najverjetneje pripišemo slabši organiziranosti aktinskih vlaken, v primerjavi s kontrolo, kjer je celična morfologija bolj razvejana zaradi bolj urejenih aktinskih vlaken. Poleg tega je bila v vzorcih tudi preraščenost manjša v primerjavi s kontrolo, saj so celice

rastle v skupkih po dve, v kontrolah pa smo jih opazovali v bolj ločenih otočkih. Opazili smo tudi, da so se keratinociti pogosto obdali z NV in se potem razraščali vzdolž njih.



Slika 32: Keratinociti pod fluorescenčnim mikroskopom, potem ko smo jih predhodno inkubirali 24 in 72 h. Na levi je prikazana kontrola, v kateri so keratinociti na golem krovnem stekelcu, na desni pa celice, ki smo jih gojili na NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA.

Očitno NV močno vplivajo na celično obnašanje v kulturi *in vitro*, kar je najbolj vidno v spremenjeni obliki keratinocitov. Opisani eksperiment pa je le začetek preučevanja vpliva topografije NV na celično morfologijo *in vitro*, zato bodo potrebne še dodatne študije, ki bodo razjasnile kaj, kako in zakaj vpliva na takšen rezultat. Nekaj takšnih eksperimentov je že v teku.

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo preučevali NV izdelana s postopkom ES iz različno koncentriranih raztopin PVA (od 8 do 12 %), in sicer brez in z vgraditvijo zdravilne učinkovine levofloksacina (L), ki bi jih lahko uporabljali kot osnovo za načrtovanje sodobnih oblog za pospešeno celjenje ran.

Naše eksperimentalno delo je vključevalo vse, od fizikalnega vrednotenja raztopin polimera, izdelave, vrednotenja in stabilizacije NV brez in z dodatkom zdravilne učinkovine L, študija hidratacije in erozije, preučevanja sproščanja L iz NV, pa do testiranja vplivov NV na kulturi keratinocitov.

Ugotovili smo, da viskoznost in prevodnost raztopin PVA naraščata tako s povečevanjem koncentracije polimera, kot po dodatku L. Po določitvi optimalnih parametrov ES (napetost 15 kV, razdalja 15 cm, pretok 0, 42 do 0, 70 ml/ h) smo iz vseh različno koncentriranih raztopin PVA izdelali NV in ugotovili, da so se njihovi povprečni premeri povečali s koncentracijo, medtem ko so se po dodatku L zmanjšali. To lahko pripišemo sovpadajočim lastnostim različno koncentriranih raztopin in delovanju različnih sil med procesom ES.

Pri pregledu posnetkov SEM smo ugotovili, da so bila vsa NV izdelana izključno iz polimernih raztopin PVA gladka, okrogla in brez vozlov, medtem ko so se ob dodatku L pojavili posamezni vozli, in sicer v primeru NV izdelanih iz 8 in 9 % raztopine PVA. Ugotovili smo, da je na vgradnjo L v NV vplivala razlika v hitrosti njegove kristalizacije in sušenja polimera med postopkom ES. Ker so bila NV popolnoma nestabilna v vodnem mediju, smo jih fizikalno stabilizirali bodisi z namakanjem v dveh netopilih, MeOH in EtOH ali pa s toploto. Pri tem smo ugotovili, da se je povprečni premer NV stabiliziranih v MeOH brez in z dodatkom L opazno povečal. To smo pripisali zmožnosti njihovega nabrekanja v MeOH. Do manjšega povečanja premerov pa je prišlo tudi pri NV, ki smo jih stabilizirali v EtOH. Toplotna stabilizacija pa na premer NV ni imela signifikantnega vpliva. Ugotovili smo, da je način stabilizacije pomembno vplival na morfologijo NV, pri čemer se je v primeru toplotne stabilizacije njihova struktura popolnoma ohranila, po stabilizaciji v MeOH in EtOH pa se je sicer ohranila fibrilarna struktura NV, vendar pa vlakna niso bila več gladka in okrogla, temveč so se na nekaterih mestih delno zlila skupaj.

Ugotovili smo, da je način stabilizacije vplival tudi na vgrajeno zdravilno učinkovino L. V tem smislu je bila za NV, ki so vsebovala L najprimernejša stabilizacija z MeOH, ki ni povečala poroznosti NV, torej ni vplivala na PVA, kot se je to zgodilo pri toplotni stabilizaciji in tudi ni povzročila razpada L, kot se je to zgodilo pri stabilizaciji z EtOH.

S študijem hidratacije in erozije smo ugotovili, da je bil najučinkovitejši način stabilizacije NV iz PVA brez L pred simulirano fiziološko razgradnjo v fosfatnem pufru s pH 7, 4, stabilizacija s toploto. Hidratacija tovrstnih NV je namreč trajala najdlje, erozija pa se je začela najkasneje. V tem smislu je bila manj primerna stabilizacija v MeOH, najslabša pa tista v EtOH. Ne glede na uporabljeno vrsto stabilizacije pa smo dokazali, da NV ohranijo fibrilarno strukturo tudi po končanem preskusu in v roku 5 dni v fosfatnem pufru še vedno ne razpadejo popolnoma.

Preverjali smo tudi čistost in stabilnost L v fosfatnem pufru, MeOH ter pri povišani temperaturi in dokazali da EtOH vpliva na strukturo te učinkovine.

Sproščanje L iz NV smo preučevali na NV izdelanih iz 10 % raztopine PVA, ki smo jih stabilizirali v MeOH in s toploto, za kar smo se odločili na osnovi predhodnih raziskav (morfologije, premerov, hidratacije in erozije NV ter stabilnosti L). Učinkovitost vgradnje L v NV je bila nizka, profili sproščanja pa so kazali hiter začetni porast koncentracije, pri čemer je bilo njihovo sproščanje hitrejše v primeru toplotno stabiliziranih NV, ki so imela L tudi na površini. Iz NV, stabiliziranih z MeOH se je tako vsa učinkovina sprostila v 5 dneh, iz toplotno stabiliziranih pa že v 90 min.

V sklopu preučevanja biološkega odziva gojenih keratinocitov na nastalo podlago iz NV smo ugotovili, da ta močno vplivajo na lastnost celic, ki so se iz vretenastih spremenile v okroglaste, zmanjšala se je njihova preraščenost, poleg tega pa smo ugotovili, da so rastle v manjših skupkih.

Naše izsledke lahko sklenemo z ugotovitvijo, da bi v nadaljnjih raziskavah nujno bilo potrebno optimizirati postopek vgradnje zdravilne učinkovine v NV, da bi dosegli želen profil sproščanja, ter narediti še dodatne raziskave na celičnih kulturah, da bi razjasnili vpliv NV na njihovo rast. Nedvomno pa izdelana NV izkazujejo velik potencial kot sodobne obloge za celjenje ran, ki bi znatno izboljšale celjenje.

6 LITERATURA

1. Zhang Y., Lim C. T., Ramakrishna S., Huang Z.-M. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of materials science: Materials in medicine* 2005; 16: 933- 946
2. Gunn J., Zhang M. Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges. *Trends and Biotechnology* 2010; 4: 189- 197
3. Sill J. T., von Recum H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 1989- 2006
4. Frenot A., Chronakis I. S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2003; 8: 64- 75
5. Ioannis S., Chronakis Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process- A review. *Journal of Materials Processing Technology* 2005; 167: 283- 293
6. Huang Z.- M., Zhang Y.- Z., Kotaki M., Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Tehnology* 2003; 63: 2223- 2253
7. Taepaiboon P., Rungsardthong U., Supaphol P. Drug- loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibers and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology* 2006; 17: 2317- 2329
8. Yoo H. S., Kim T. G., Park T. G., Surface- functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 2009; 61: 1033- 1042
9. Thompson C. J., Chase G. G., Yarin A. L., Renker D. H. Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer* 2007; 48: 6913- 6922
10. Beachley V, Wen X. Polymer nanofibrous structures: fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Sci* 2010; 35: 868- 892.

11. Thakur R. A., Florek C. A., Kohn J., Michniak B. B. Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *Int. J. Pharm.* 2008; 364: 87- 93
12. Bhardway N., Kundu S. C. Electrospinning: A fascinating fiber technique. *Biotechnol Advances* 2010; 28 (3): 325- 347
13. Lee K. Y., Jeong Lim, Kang Y. O., Lee S. J., Park W.H. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Adv. Drug Del. Rev.* 2009; 61: 1020- 1032
14. Kumbar S. G., Nukavarapu S. P., , James R., Hogan M. V., Laurenchin C.T. Recent Patents on Electrospun Biomedical Nanostructures: An Overview. *Recent Patents on Biomed Eng* 2008; 1: 68 78
15. Deitzel J. M., Kleinmeyer J., Harris D., Beck Tan N.C. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 2001; 42: 261- 272
16. Jiang H., Hu Y., Li Y., Zhao P., Zhu K., Chen W. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *J. Control. Rel.* 2005; 108: 237- 243
17. Supaphol P., Surawut C. On the Electrospinning of Poly(vinyl alcohol) Nanofiber Mats: A Revisit. *J. Apl. Polymer Sci.* 2008, 108: 969- 978
18. Tao J. Effects of Molecular Weight and Solution Concentration on Electrospinning of PVA. *Materials Sci. Eng.* 2003; 1- 96
19. Jannesari M., Varshosaz J., Morshed M., Zamani M. Composite poly (vinyl alcohol)/ poly (vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *Int. J. Nanomed.* 2011; 6: 993- 1003
20. Kenawy E.- R., Abdel- Hay F.- I., El- Newehy M. H., Wnek G. E. Controlled release of ketoprofen from electrospun poly (vinyl alcohol) nanofibers. *Materials Science and Engineering A* 2007; 459: 390- 396
21. Ding B., K. h.- Y, Lee S.- C., Shao C., Lee D.- R., Park S.- J., Kwag G.-B., Choi K.-J. Preparation and Characterization of a Nanoscale Poly (vinyl alcohol) Fiber Aggregate Produced by an Elctrospinning Method. *J. Polymer Sci.: Part B Polymer Physics* 2002; 40: 1261- 1268
22. Devi M. L., Chandrasekhar K. B. A validated stability- indicating RP- HPLC method for levofloxacin in the presence of degradation products, its process related

- impurities and identification of oxidative degradant. *J. Pharm. Biom. Anal.* 2009; 50: 710- 717
23. Koeppe M. O., Cristofolletti R., Fernandes E. F., Storpirtis S., Junginger H. E., Kopp S., Midha K. K., Shaha V. P., Stavchansky S., Dressman J. B., Barends D. M. Biowaiver Monograph for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms : Levofloxacin. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100: 1628- 1634
24. Hugo W. B., Russell A. D. *Pharmaceutical Microbiology*, šesta izdaja, Blackwell Science, London, 1998; 175
25. Beachley V., Wen X. Polymer nanofibrous structures: fabrication, biofunctionalisation and cell interaction. *Progres in Polymer Science* 2010; 35: 868- 892
26. Heričko Ž: Izdelava polimernih nanovlaken z metodo elektrorazprševanja in njihovo vrednotenje, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Ljubljana, 2011; 41- 47
27. Medicinski e- slovar, Lek d.d., 2000
28. Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Nemčija, Polivinilalkohol Mowiol ®
29. Cao S.- G., Liu Z.- F., Hu B.- H., Liu H.- Q. Stabilization of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibrous mats in aqueous solution. *Chinese J. Polym. Sci.* 2010; 28: 781- 788
30. Göpferich A., Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biometaterials* 1996; 17: 103- 114