

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA NOVAK

**IZDELAVA IN VREDNOTENJE UREJENIH NANOVLAKEN IZ
POLIVINILALKOHOLA Z METODO ELEKTROSTATSKEGA
SUKANJA**

PREPARATION AND EVALUATION OF ALIGNED ELECTROSPUN
POLY(VINYL) ALCOHOL NANOFIBERS

Ljubljana, 2013

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

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Julijani Kristl, mag. farm. in delovnima mentorjema dr. Romani Rošic, mag. farm. in asist. Janu Pelipenku, mag. farm. za nasvete in pomoč pri raziskovalnem delu za diplomsko nalogo. Za izdelavo SEM slik sem hvaležna doc. dr. Petri Kocbek, mag. farm.

Prav prisrčno se zahvaljujem svojim staršem in vsem, ki so verjeli vame in me podpirali v času študija.

IZJAVA

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

Ana Novak

Diplomska komisija

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

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

Član komisije: asist. dr. Matjaž Ravnkar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
POVZETEK.....	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 NANOVLAKNA.....	1
1.2 NAMEN IN UPORABA NANOVLAKEN.....	1
Tkivno inženirstvo.....	2
Celjenje ran.....	2
Dostava zdravilnih učinkovin.....	3
1.3 ELEKTROSTATSKO SUKANJE	4
Vplivi spremenljivk na izdelavo nanovlaken	5
Modifikacije elektrostatskega sukanja za izdelavo urejenih nanovlaken.....	7
1.4 METODE ZA MERJENJE UREJENOSTI NANOVLAKEN.....	10
Merjenje kotov.....	11
Metoda hitre Fourierove transformacije	12
1.5 STATISTIČNA OBDELAVA.....	14
Enofaktorska analiza varianc.....	14
1.6 POLIVINILALKOHOL	15
2 NAMEN DELA.....	16
3 EKSPERIMENTALNO DELO.....	17
3.1 MATERIALI	17
3.2 NAPRAVE	17
3.3 POSTOPKI IN METODE.....	18
Priprava raztopin polivinilalkohola	18
Izdelava urejenih nanovlaken	18
Vrednotenje nanovlaken	19
Statistična obdelava podatkov	22

4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23
4.1	VREDNOTENJE MORFOLOGIJE IZDELANIH NANOVLAKEN	23
	Vpliv obratov.....	23
	Vpliv koncentracije.....	23
	Vpliv napetosti.....	24
	Vpliv razdalje	25
4.2	VREDNOTENJE PREMIERA NANOVLAKEN	26
	Vpliv obratov.....	26
	Vpliv koncentracije.....	27
	Vpliv napetosti.....	27
	Vpliv razdalje med kovinsko iglo in zbiralom	29
4.3	VREDNOTENJE UREJENOSTI NANOVLAKEN	30
	Vrednotenje urejenosti z metodo merjenja kotov	30
	Vrednotenje urejenosti z metodo hitre Fourierove transformacije.....	33
	Vpliv pogojev elektrostatskega sukanja na urejenost nanovlaken	35
	Primerjava uporabljenih metod za vrednotenje urejenosti nanovlaken.....	41
4.4	MOŽNOSTI OPTIMIZACIJE UREJENIH NANOVLAKEN	42
5	SKLEP	44
6	LITERATURA	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Sliki neurejenih (A) in urejenih NV (B), posneti z vrstičnim elektronskim mikroskopom.	1
Slika 2: Razrast keratinocitov na neurejenih (A) in urejenih NV (B) (12).....	3
Slika 3: Shema, ki prikazuje mehanizem elektrostatskega sukanja in nastanek NV.....	4
Slika 4: Shematski prikaz električnega polja, ki nastane med kovinsko iglo in vzporednima elektrodama.	8
Slika 5: Vrteči boben.	8
Slika 6: Vrteči žičnati boben.	9
Slika 7: Vrteči disk.	9
Slika 8: Naprava za zbiranje NV na notranjem obodu.	10
Slika 9: Merjenje kotov (rumeni črti) glede na referenčno linijo (modra črta).	11
Slika 10: Merjenje kotov (rumene črte) glede na vertikalno linijo (modre črte).....	11
Slika 11: Prikaz izvedbe FFT metode na neurejenih (A) in urejenih NV (B).	12
Slika 12: Prikaz normalizacije FFT metode neurejenih (A) in urejenih NV (B).	13
Slika 13: Shema naprave za elektrostatsko sukanje.	18
Slika 14: Generator visoke napetosti (A), plastična brizga s kovinsko iglo, vpeta v črpalko (B) in vrteče zbiralo (C).	19
Slika 15: Primer merjenja kotov.	20
Slika 16: Razlike pred (zgoraj) in po (spodaj) modifikaciji merjenja kotov.	21
Slika 17: Primer izpisa statistike iz SPSS. Z rdečo so označene statistične vrednosti p.	22
Slika 18: SEM slike NV pri različnih obratih, 10% PVA, 15 cm in 25 kV.	23
Slika 19: SEM slike NV pri različnih koncentracijah, 15 kV, 15 cm in 6000 rpm.	24
Slika 20: Sploščeno NV (rdeča obroba) in razvejano NV (rumena obroba) pri 12% PVA, 15 cm, 15 kV in 6000 rpm.	24
Slika 21: SEM slike NV pri različnih napetostih, 10% PVA, 15 cm in 6000 rpm.	25
Slika 22: SEM slike NV pri različnih razdaljah, 8% PVA, 15 kV in 6000 rpm.	25
Slika 23: Histograma visoko urejenih NV in pripadajoči SEM sliki.	30
Slika 24: Primer odčitavanja števila NV, ki so na intervalu od -10° do 10°.	31
Slika 25: Histograma izmerjenih kotov neurejenih NV in pripadajoči SEM sliki.	32
Slika 26: Grafa FFT urejenih NV in pripadajoči SEM sliki.	33
Slika 27: Graf FFT lažno urejenih NV in pripadajoča SEM slika.	34

Slika 28: Grafi FFT urejenih NV s približno enakimi vrhovi, ki smo jim preračunali površine vrhov.	34
Slika 29: Grafa FFT neurejenih NV in pripadajoči SEM sliki.	35
Slika 30: Histogrami kotov in grafi FFT s pripadajočimi SEM slikami NV pri različnih obratih, 10% PVA, 15 cm in 25 kV.	36
Slika 31: Histogrami kotov in grafi FFT s pripadajočimi SEM slikami NV pri različnih koncentracijah, 10 cm, 25 kV in 6000 rpm.	37
Slika 32: Histogrami kotov in SEM slike NV pri različnih napetostih, 10% PVA, 15 cm in 6000 rpm.	38
Slika 33: Grafi FFT in SEM slike NV pri različnih napetostih, 10% PVA, 15 cm in 6000 rpm.	39
Slika 34: Histogrami kotov in grafi FFT s pripadajočimi SEM slikami NV pri različnih razdaljah, 10% PVA, 25 kV in 6000 rpm.	40

POVZETEK

Podrobnejše proučevanje izdelave in uporabe nanovlaken je vodilo do stopnje v razvoju, kjer za specifičen namen lahko pripravimo nanovlakna s točno določenimi lastnostmi. Pri tem na področju biomedicine v zadnjih letih še zlasti izstopa težnja po izdelavi urejenih nanovlaken, saj le-ta s svojo strukturo posnemajo zunajcelično ogrodje visoko urejenih tkiv ter drastično vplivajo na hitrejšo in usmerjeno razrast celic.

Namen našega dela je bil izdelati urejena nanovlakna iz polivinilalkohola z elektrostatskim sukanjem na vrtečem zbiralu v obliki bobna, ki smo ga zasnovali na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo. S sistematičnim spreminjanjem pogojev elektrostatskega sukanja in lastnosti polimernih raztopin smo natančno preučili vpliv posameznih parametrov na morfologijo in urejenost izdelanih nanovlaken. Vizualizacijo dobljenega produkta smo opravili z elektronsko mikroskopijo in nastale slike ovrednotili z objektivnimi grafičnimi metodami.

Premeri polivinilalkoholnih nanovlaken so bili med 150 in 700 nm, pri čemer je na spreminjanje premera najbolj vplivala koncentracija polimera, medtem ko hitrost vrtenja zbirala ni imela vpliva, kar smo tudi statistično dokazali. Največjo urejenost smo dosegli pri 10% (m/m) raztopini polivinilalkohola, razdalji med kovinsko iglo in zbiralom 15 cm, napetosti 25 kV in hitrosti vrtenja zbirala 6000 rpm, kar smo določili in potrdili z dvema različnima metodama, in sicer metodo merjenja kotov ter metodo hitre Fourierove transformacije. Največji vpliv na urejenost nanovlaken je imela hitrost vrtenja zbirala, nasprotno pa spreminjanje koncentracije polivinilalkohola na urejenost ni imelo posebnega vpliva.

Rezultati diplomskega dela nedvomno predstavljajo temeljno osnovo za nadaljnji razvoj urejenih nanovlaken, ki dandanes izkazujejo izreden potencial za izdelavo različnih visoko strukturiranih tkivnih nadomestkov in naprednih oblog za celjenje ran.

ABSTRACT

Comprehensive studies dealing with the preparation and usefulness of nanofibers have led the development to a stage where nanofibers with desired properties can be prepared for a specific purpose. In the biomedical field particularly aligned nanofibers have shown great potential recently, since the latter are able to mimic the structure of extracellular matrix of highly aligned tissues as well as enhance and guide cell growth.

The aim of diploma thesis was preparation of aligned electrospun nanofibers from poly(vinyl) alcohol using rotating drum, that was designed at the University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy. With systematic changing the influence of electrospinning conditions and properties of polymer solution on nanofiber morphology and alignment was studied in details. Electron microscopy was used to visualize product and the resulting images were evaluated by objective graphical methods.

Average diameter of poly(vinyl) alcohol nanofibers varied from 150 to 700 nm. The concentration of a polymer influenced the nanofibrous diameter the most; on the contrary, rotation speed of collector had no influence on it, which was also statistically confirmed. The degree of alignment was highest when nanofibers were prepared from 10% (w/w) poly(vinyl) alcohol solution, at distance between metal needle and collector 15 cm, applied voltage 25 kV and collector rotational speed of 6000 rpm, which was determined and confirmed by two different methods, angle measurements and fast Fourier transformation. The degree of alignment strongly depended on rotating speed of a collector, whereas changing the poly(vinyl) alcohol concentration did not affect the orientation of nanofibers. The results undoubtedly provide a fundamental basis for further development of aligned nanofibers, which nowadays are showing great potential for different highly-structured tissue substitutes and advanced wound dressings.

SEZNAM OKRAJŠAV

ANOVA ... enofaktorska analiza varianc

ECM zunajcelično ogrodje

FFT hitra Fourierova transformacija

NV nanovlakna

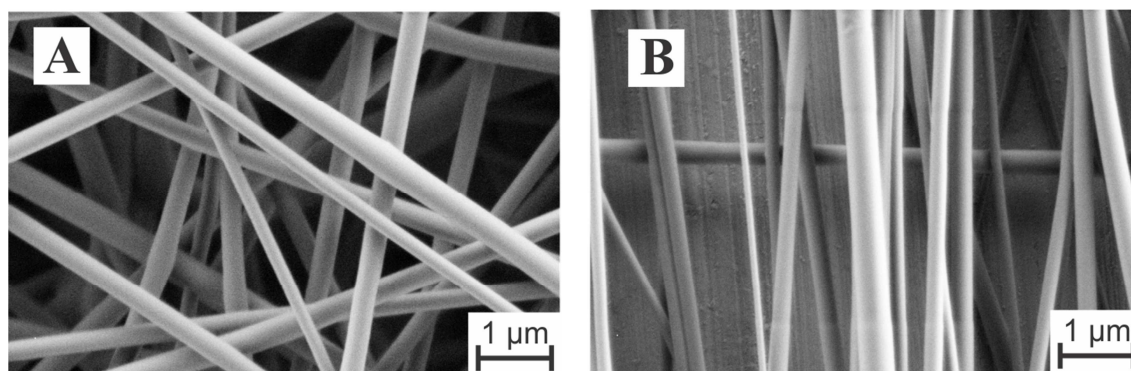
PVA polivinilalkohol

SEM vrstični elektronski mikroskop

1 UVOD

1.1 NANOVLAKNA

Nanovlakna (NV) so po definiciji tanka trdna vlakna, katerih premer je na nanometrskem nivoju, njihova dolžina pa je teoretično neomejena (slika 1A). V primerjavi z drugimi sistemi večjih dimenzij imajo NV zaradi svoje velikosti ogromno površino na enoto mase ter drugačne mehanske lastnosti, kot sta trdnost in prožnost. NV običajno tvorijo tridimenzionalno mrežo z naključno urejenostjo in z visoko poroznostjo (1, 2). Za izdelavo NV je na voljo več tehnik, ki omogočajo uporabo širokega izbora polimerov, s tem pa nastanek NV z najrazličnejšimi lastnostmi. Intenzivne raziskave in podrobnejše poznavanje ter nadzor izdelave NV so med drugim omogočile tudi izdelavo NV z bistveno bolj urejeno strukturo. Urejena NV lahko definiramo kot NV, ki imajo eno smer orientiranosti (slika 1B) – vsa torej ležijo v isti smeri, zaradi česar pa izkazujejo drugačne morfološke lastnosti (3). Za nanose urejenih NV je značilno, da imajo vzdolž urejenosti večjo elastičnost, prožnost in natezno napetost kot v smeri pravokotno na urejenost. Izboljšane elastične lastnosti so še posebej pomembne pri rokovanju, saj preveč krhki nanosi NV niso primerni za uporabo (4).



Slika 1: Sliki neurejenih (A) in urejenih NV (B), posneti z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

1.2 NAMEN IN UPORABA NANOVLAKEN

Zaradi široke možnosti izbire polimerov za izdelavo NV je njihova uporabnost vsestranska, saj jih lahko izkoriščamo na različnih področjih, na primer v biomedicini, kozmetiki, tekstilstvu, elektrotehniki, optiki in filtraciji. Dandanes največ raziskav poteka na področju biomedicine, kjer razvijajo in preučujejo NV za izdelavo protez, tkivnih nadomestkov, naprednih oblog za celjenje ran in dostavnih sistemov za ciljan vnos zdravilnih učinkovin (3).

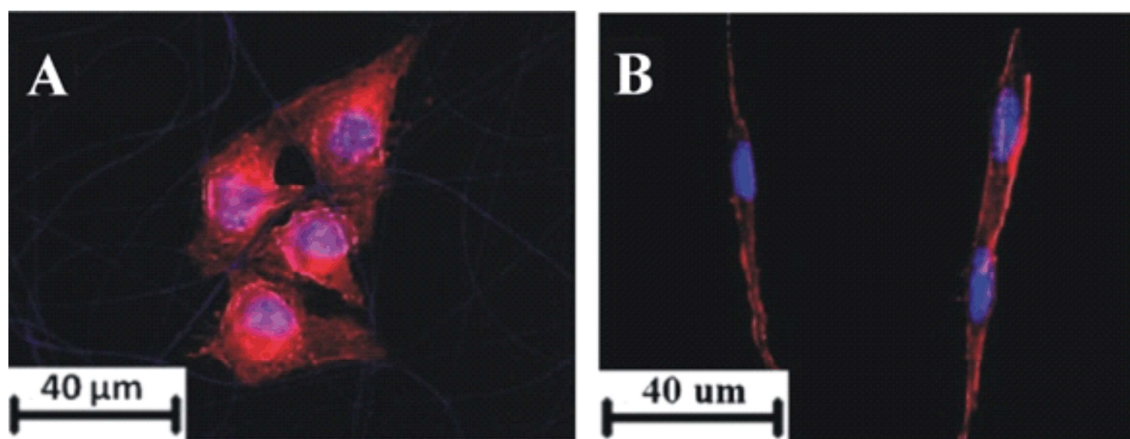
Tkivno inženirstvo

Tkivno inženirstvo je interdisciplinarno področje, ki se ukvarja z razvojem funkcionalnih nadomestkov, ki vzpodbujajo fiziološke procese obnove, vzdrževanja ali izboljšanja delovanja posameznega tkiva ali organa (5). Pri izdelavi tkivnih nadomestkov se NV uporabljajo zaradi svoje edinstvene sposobnosti posnemanja naravnega zunajceličnega ogrodja (ECM) tako po strukturnih kot tudi po funkcionalnih lastnostih, kar posledično pomeni, da po aplikaciji služijo kot ogrodja za pritrjevanje in razvoj celic. Še več, relativno enostavne modifikacije izdelanih NV omogočajo prilagoditev specifičnim potrebam posameznega tkiva. Na tem mestu velja poudariti, da je pri tem potrebno zagotoviti biokompatibilnost in biorazgradljivost nadomestka, hkrati pa tudi dovolj visoko poroznost za infiltracijo celic (6). Izbira biokompatibilnih polimerov namreč omogoča ustrezno vključevanje tkivnega nadomestka v fiziološko okolje ter zmanjša možnosti za vnetne in imunske reakcije po implantaciji. Nadalje biorazgradljivost sistema odpravi dodaten poseg, potreben za odstranitev nadomestka, slednja pa mora biti nadzorovana in slediti hitrosti nastajanja novega tkiva. Na migracijo in infiltracijo celic dodatno pomembno vplivata še gostota in velikost por med posameznimi NV. Tako se v primeru, ko je velikost por manjša od velikosti samih celic, lahko zgodi, da NV celico ujamejo in preprečijo njeno nadaljnje gibanje po in v mreži. Nasprotno pa urejena omogočajo usmerjeno razrast celic, saj le-te sledijo orientiranosti NV. Možnost uporabe NV se s tem razširi tudi na regeneracijo visoko sestavljenih in organiziranih tkiv, kot so žile, živci, srčna in skeletna mišica ter kite in ligamenti (7). Raziskave so pokazale, da omogočajo urejena NV pri regeneraciji žilnega tkiva boljšo adhezijo in proliferacijo gladko mišičnih celic ter njihovo porazdelitev vzdolž NV, prav tako pa tudi pri regeneraciji perifernih živcev zagotovijo usmerjeno razrast aksonov in migracijo celic nevroglije. Nadalje so *in vitro* študije na nevralnih matičnih celicah pokazale hitrejšo razrast in diferenciacijo nevritov na urejenih NV v primerjavi z neurejenimi (8, 9). Prednost urejenih NV se je izkazala tudi pri izdelavi kostnih nadomestkov, saj je uporaba le-teh povečala mehansko trdnost nadomestka (7).

Celjenje ran

Rana je definirana kot odprta poškodba kože in globljega tkiva ali sluznic zaradi fizikalnih dejavnikov. Za akutne rane je značilno, da so se sposobne popolnoma same zaceliti v približno 8 tednih, kronične rane pa se zaradi motenega procesa celjenja celijo zelo počasi oziroma se sploh ne zacelijo, zato je njihova oskrba še posebej pomembna. Eden izmed

glavnih vzrokov neceljenja kroničnih ran je onemogočeno nastajanje ECM zaradi povišanih vrednosti metaloproteaz, ki ga razgrajujejo. Smiselno je pričakovati, da v kolikor v takšno rano apliciramo analog ECM, s tem omogočimo pritrjevanje celic, kar pa spodbudi in pospeši lastno regeneracijo poškodovane plasti kože (10, 11). Med najodobnejše analoge ECM spadajo prav NV, saj so ta sposobna posnemati njegove fibrilarne elemente tako po obliki kot tudi velikosti in mehanskih lastnostih. Po aplikaciji NV, urejenih v smeri čez rano, se celice razrastejo vzdolž le-teh, se pri tem tudi morfološko spremenijo, in sicer tako, da se izrazito podaljšajo (slika 2B), posledično pa se tako rana hitreje zapre. Še več, NV kot obloga varujejo rano pred vdorom bakterij, vpijajo njene izločke, ob uporabi ustreznih hidrofilnih materialov zagotavljajo vlažno mikrookolje na rani, v ali na NV pa lahko vgradimo tudi zdravilne učinkovine (antibiotike, rastne dejavnike), ki še aktivneje posegajo v proces celjenja (3, 12).



Slika 2: Razrast keratinocitov na neurejenih (A) in urejenih NV (B) (12).

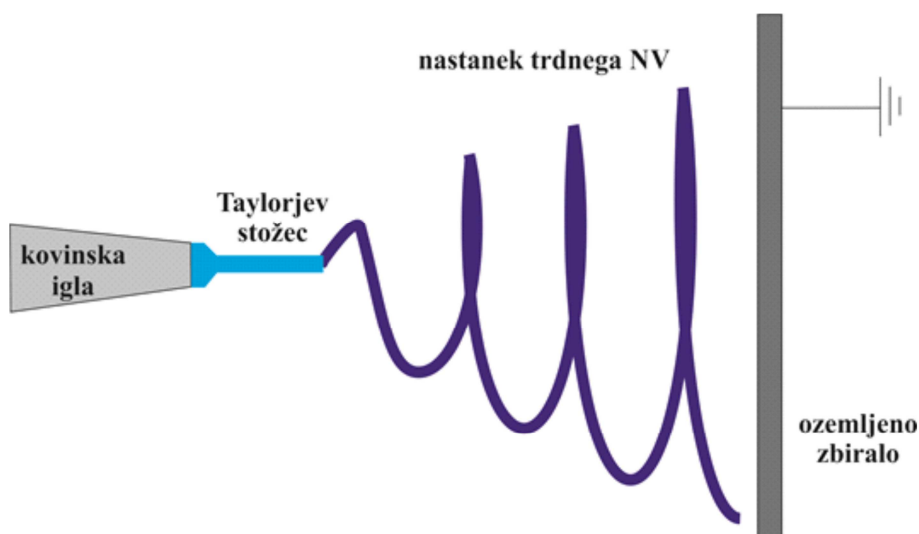
Dostava zdravilnih učinkovin

NV lahko uporabimo kot dostavne sisteme za različne zdravilne učinkovine (antibiotike, analgetike, citostatike, proteine, DNK), pri čemer na možnost njihovega vgrajevanja in princip sproščanja vpliva izbira polimera. Učinkovine so lahko bodisi vključene v notranjost NV bodisi adsorbirane ali vezane na njihovo površino. Sproščanje je zaradi velike specifične površine NV in poroznosti sistema ter običajno tudi amorfnosti oblike učinkovine nezadržano s hitrim začetnim porastom koncentracije, za doseg podaljšanega sproščanja pa je potrebno NV dodatno modificirati, na primer izdelati NV z jedrom in ovojnico (3, 7).

1.3 ELEKTROSTATSKO SUKANJE

Najpogostejše uporabljena, sodobna, vsestranska, učinkovita in enostopenjska metoda za izdelavo NV je elektrostatsko sukanje (*ang. electrospinning*), ki ob uporabi visoke napetosti omogoči nastanek trdih nanovlaken iz polimerne raztopine ali taline. Za elektrostatsko sukanje so v osnovi potrebni: i) ustrezna raztopina polimera, ii) generator visoke napetosti, iii) črpalka, ki zagotavlja konstanten pretok raztopine skozi ozko kovinsko iglo in iv) ozemljeno prevodno zbiralo.

Raztopina polimera pred priključitvijo visoke napetosti kaplja skozi ozko kovinsko iglo s konstantnim pretokom. Ob dovajanju visoke napetosti pa se površina te kapljice nabije, kar po eni strani povzroči nastanek odbojnih sil med nabitimi delci znotraj polimerne raztopine, po drugi pa pojav privlačnih sil med kapljico polimera in ozemljenim zbiralom, ki predstavlja nasprotno nabito elektrodo. Skupek nastalih sil sedaj nasprotuje silam površinske napetosti raztopine, kar vodi v preoblikovanje in podaljševanje polimerne kapljice v t. i. Taylorjev stožec. Z nadaljnjim višanjem napetosti in dosego kritične točke, kjer elektrostatske sile prevladajo nad silami površinske napetosti, se iz konice Taylorjevega stožca tvori nabit curek, ki pospešeno potuje proti zbiralu (slika 3). Na tej poti je curek podvržen različnim silam in nestabilnostim, ki se kažejo kot podaljševanje in tanjšanje curka, zvijanje in razcepitve ter spremembe poti, vse to pa vpliva na končno obliko NV. Na poti do zbirala izhlapi tudi topilo, kar omogoča nastanek suhih in trdih NV, ki sprva še ohranijo naboj in se pritrdijo na zbiralo (1, 13).



Slika 3: Shema, ki prikazuje mehanizem elektrostatskega sukanja in nastanek NV.

Vplivi spremenljivk na izdelavo nanovlaken

Uspešnost elektrostatskega sukanja in morfologijo izdelanih NV znatno določajo številne različne spremenljivke, ki jih v splošnem lahko razdelimo na lastnosti polimerne raztopine (viskoznost, prevodnost, površinska napetost), procesne parametre (uporabljena električna napetost, razdalja med iglo in zbiralom, pretok raztopine skozi iglo in vrsta zbiralca) in dejavnike okolja (temperatura, relativna vlažnost) ter jih bomo na kratko obravnavali v nadaljevanju. Pred tem velja še poudariti, da so vse spremenljivke medsebojno odvisne, do nastanka gladkih nanovlaken brez vozlov pa bo vodila le optimalna izbira vseh parametrov.

Koncentracija in viskoznost raztopine polimera

Koncentracija polimera in posledično viskoznost njegove raztopine vplivata tako na sposobnost tvorbe curka kot tudi na premer in morfologijo NV. Prenizke koncentracije namreč onemogočajo nastanek NV, saj se curek razprši v kapljice še preden doseže zbiralo. Prav tako se pri nižjih koncentracijah v morfologiji NV pogosteje pojavljajo anomalije, kot so vozli, kapljice in stiki med NV. Povečevanje koncentracije polimera odstrani te anomalije in omogoča nastanek stabilnega kontinuiranega curka, v splošnem pa se z višanjem koncentracije veča tudi premer NV. Omenjeno seveda velja le do neke meje, ko previsoka viskoznost onemogoči zadostno izhlapevanje topila, zaradi česar se na zbiralo naberejo mokra NV, oziroma prepreči zagotavljanje konstantnega pretoka raztopine skozi iglo, s tem pa nastanek curka. (6, 7, 14).

Prevodnost raztopine polimera

Električna prevodnost raztopine določa naboj na površini kapljice in odbojne sile znotraj nje, kar pod vplivom električne napetosti povzroči deformacijo kapljice in nastanek curka (15). Pri tem povečevanje prevodnosti polimerne raztopine preprečuje nastanek vozlov, saj se zaradi večje gostote naboja in s tem večjih sil okrepi podaljševanje curka, posledično pa zaradi tega nastanejo tudi tanjša NV. Prevodnost raztopin lahko enostavno povečamo z dodatkom soli in ionskih površinsko aktivnih snovi. Raziskave so pri tem pokazale, da soli z manjšimi ionskimi premeri (na primer NaCl) v primerjavi s solmi z večjimi ionskimi premeri (na primer KH_2PO_4) vplivajo na nastanek NV z manjšimi premeri. Manjši ioni imajo namreč večjo ionsko gostoto, kar omogoča njihovo boljšo mobilnost v električnem polju ter ojača sile, ki delujejo na podaljševanje curka NV (6, 14, 16).

Površinska napetost raztopine polimera

Pri elektrostatskem sukanju površinska napetost uporabljene raztopine določa minimalno električno napetost, ki je potrebna za izdelavo NV. Površinska napetost preprečuje deformacijo kapljice raztopine polimera na koncu kovinske igle, zato je tvorba NV mogoča šele, ko dovedena električna napetost preseže sile površinske napetosti. Zmanjševanje površinske napetosti raztopine polimera z dodatkom soli omogoča elektrostatsko sukanje pri nižjih napetostih, kar zmanjša nestabilnost curka in s tem pojavljanje vozlov ter poveča varnost dela (6, 14, 17).

Molekulska masa polimera

Molekulska masa polimera določa viskoznost, površinsko napetost, prevodnost in dielektrično konstanto polimerne raztopine, s tem pa vpliva na obnašanje curka med procesom elektrostatskega sukanja. Molekulska masa polimera pravzaprav odraža zmožnost raztegovanja verig v raztopini, kar se izrazi na viskoznosti in tako vpliva na morfologijo NV. Iz raztopin polimerov z višjo molekulsko maso nastanejo NV z večjimi premeri ter manjšo prisotnostjo vozlov in kapljic (6, 14, 17, 18).

Pretok skozi iglo

Pretok polimerne raztopine skozi kovinsko iglo določa količino raztopine, ki je na voljo za nastanek curka in tvorbo NV. Večji uporabljen pretok se odraža v obliki večjih premerov NV, kar pa ponovno velja le do določene meje, ko nadaljnje višanje pretoka vodi v nastanek vozlov (6, 7, 14, 15).

Električna napetost

V procesu elektrostatskega sukanja je visoka električna napetost bistvena. Dovaja namreč naboj v raztopino polimera, s tem ustvari elektrostatske sile, ki premagujejo sile površinske napetosti in tako se omogoči nastanek NV. Prenizko uporabljene napetosti onemogočajo nastanek curka; v primeru da se curek vendarle tvori, pa se na NV zaradi nezadostnih sil za raztegnitev polimernih verig pojavijo vozli. Ob primerno izbrani visoki napetosti bo njeno nadaljnje višanje rezultiralo v spremembi debeline curka, njen vpliv na premer NV pa se razlikuje glede na uporabljene polimere (6, 7, 14, 15).

Razdalja med iglo in zbiralom

Razdalja med konico igle in zbiralom predstavlja pot, na kateri se iz curka tvori NV, zadostna razdalja pa omogoča sušenje curka in nastanek suhih vlaken nanometerskega premera. Premer NV v splošnem z večanjem razdalje pada, pri premajhnih razdaljah pa se pojavijo anomalije, ki so večinoma posledica nezadostnega sušenja curka (6, 7, 14, 17).

Dejavniki okolja

Pri elektrostatskem sukanju so pomembni tudi dejavniki okolja, saj vplivajo na lastnosti raztopine polimera in na pogoje, pri katerih se iz curka tvori NV. Med pomembnejšimi in bolj raziskanimi dejavniki sta predvsem temperatura in relativna vlažnost okolja. Višje temperature okolja zaradi vpliva na viskoznost raztopine polimera povzročajo nastanek NV z manjšimi premeri. Po drugi strani vlažnost okolja določa hitrost izhlapevanja vode. Pri višjih relativnih vlažnostih je izhlapevanje vodnih raztopin polimerov upočasnjeno, kar podaljša čas raztegovanja curka ter povzroči nastanek NV z manjšimi premeri in manj vozli (19). V primeru izdelave NV iz hlapnih topil, visoka relativna vlažnost povzroča tudi pore na površini NV, zviševanje vlažnosti pa vpliva na koalescenca teh por. Elektrostatsko sukanje v vakuumu v primerjavi s sobnimi pogoji daje NV z večjimi premeri, ker se hitreje posuši in se ne uspe toliko raztegniti, kot v prisotnosti vlage (6).

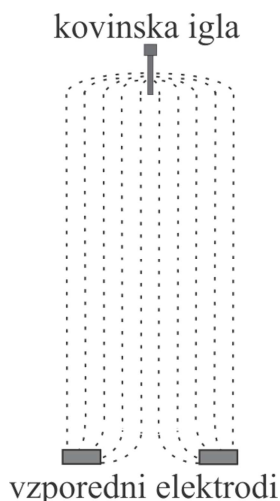
Modifikacije elektrostatskega sukanja za izdelavo urejenih nanovlaken

Za izdelavo urejenih NV je postopek elektrostatskega sukanja popolnoma enak kot pri pripravi neurejenih, s to razliko, da je potrebno uporabiti modificirano zbiralo, ki omogoča urejanje nastalih NV. V raziskavah so tako razvili različne principe zbiranja NV, najbolj vidni pa so podrobneje obravnavani v nadaljevanju.

1. Uporaba vzporednih elektrod (ang. *parallel electrodes*)

Vzporedno nameščeni elektrodi iz prevodnega materiala predstavljata enostavno stacionarno zbiralo, ki zaradi svoje postavitve povzročita razdelitev in usmeritev električnega polja k posamezni elektrodi (slika 4), s tem pa nastanek urejenih nanovlaken. Elektrostatske sile, ki nastanejo v razdeljenem električnem polju, usmerijo nabit curek proti elektrodama. Približevanje pozitivno nabitega curka povzroči nastanek nasprotnega naboja na površini elektrode. Najmočnejše elektrostatske sile nastanejo med koncem curka in robom elektrode, kar omogoča pritrdjevanje in raztegnitev NV med obema elektrodama. Zbrana NV ohranijo naboj, s tem pa zagotavljajo urejeno odlaganje novih NV zaradi

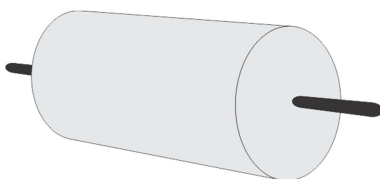
enakega naboja med njimi. Morfologija zbranih NV je odvisna od razdalje med elektrodama in časa njihovega zbiranja. Pri manjši razdalji nastanejo NV z večjim premerom, daljši čas zbiranja pa omogoča gostejši nanos, kar zmanjša vpliv odbojnih sil, ki nastanejo med odlaganjem NV (20, 21). Uporaba negativno nabitih elektrod izboljša pritrjevanje NV, saj se ustvarijo močnejše elektrostatske sile med elektrodo in nabitim curkom (22).



Slika 4: Shematski prikaz električnega polja, ki nastane med kovinsko iglo in vzporednima elektrodama.

2. Uporaba vrtečega bobna (*ang. rotating drum*)

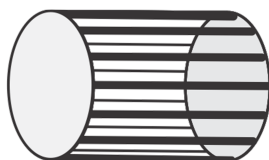
Vrteči boben (slika 5) je cilindrično zbiralo, narejeno iz prevodnega materiala, ki pri ustrezno visoki hitrosti vrtenja omogoča nastanek urejenih NV. Pri tem mora biti linearna hitrost površine vrtečega bobna enaka hitrosti potovanja curka, da se NV pritrdi na zbiralo in zaradi vrtenja urejeno odloži na površini bobna. Kadar je hitrost vrtenja bobna manjša od hitrosti curka, pride do naključnega odlaganja NV na zbiralo, usmerjenost NV pa je odvisna od kaotičnega gibanja curka. Če hitrost vrtenja bobna preseže hitrost curka, se curek zlomi in to onemogoča odlaganje NV. Hitrost vrtenja bobna poleg urejanja vpliva tudi na premer NV in sicer tako, da pri višjih hitrostih vrtenja zaradi večjega raztezanja curka nastanejo NV z manjšim premerom (3, 22, 23, 24).



Slika 5: Vrteči boben.

3. Uporaba vrtečega žičnatega bobna (*ang. rotating wire drum*)

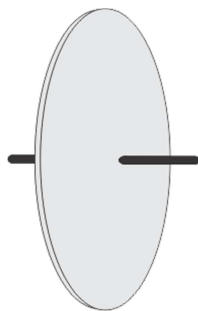
Vrteče zbiralo v obliki žičnatega bobna je sestavljeno iz žic, ki so enakomerno razporejene po plašču cilindra (slika 6), ter pravzaprav združuje lastnosti vzporednih elektrod in vrtečega bobna. NV se najprej pritrdijo na najbližjo žico bobna, ki jo doseže curek, nato pa premik bobna NV raztegne in povzroči njihovo pritrdjevanje na naslednjo žico. Pri tem je urejenost NV odvisna od prisotnih elektrostatskih sil, in sicer prvo pritrdjevanje določajo sile, nastale zaradi dovajanja visoke napetosti, drugi korak pa je odvisen od privlaka med naslednjimi žicami in nabojem NV. Pri višjih hitrostih vrtenja med žicama nastane urejena mreža NV, pri nizkih hitrostih pa se NV odlagajo predvsem na žice. Na urejenost NV vpliva tudi debelina nanosa NV, v splošnem pa velja, da so debelejši nanosi zaradi kopičenja naboja na zbranih NV manj urejeni (25).



Slika 6: Vrteči žičnati boben.

4. Uporaba vrtečega diska (*ang. rotating disc*)

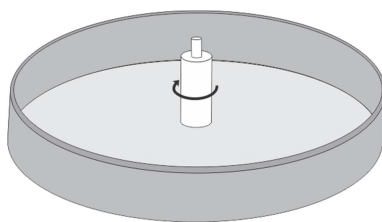
Vrteči disk (slika 7) ima ozek rob, na katerem se skoncentrira električno polje, kar posledično izboljša pritrdjevanje NV. Čeprav je širina nanosa NV zelo tanka, je glavna prednost uporabe tega zbiralnika ta, da so zbrana NV izredno urejena, saj se pri pritrdjevanju med novimi in zbranimi NV ustvari odboj. Rob zbiralnika tako privlači potujoča NV oziroma prihajajoč curek, odboj zbranih NV pa zaradi istovrstnih nabojev omogoči pritrdjevanje NV poleg zbranih NV, s tem pa je preprečeno njihovo prekrivanje. Razlike v oddaljenosti zbranih NV so odvisne od premera NV in rezidualnega naboja (3, 22, 26, 27).



Slika 7: Vrteči disk.

5. Naprava za zbiranje NV na notranjem obodu (*ang. rotating jet*)

Naprava za zbiranje NV na notranjem obodu (slika 8) je sestavljena iz prevodnega kovinskega plašča, ki je ozemljen, in vrtečega sistema za razprševanje raztopine polimera, ki je povezan z visoko napetostjo. Curek NV se iz sredine naprave razpršuje, poleg običajno prisotnih sil pa v tem primeru pri pritrdjevanju deluje tudi centrifugalna sila, ki zmanjša nestabilnost curka pri potovanju do nasprotno nabitega kovinskega plašča in omogoča bolj urejeno odlaganje NV. Zaradi vrtenja curka pride tudi do večjega raztezanja curka, kar vpliva na nastanek tanjših NV (28, 29).



Slika 8: Naprava za zbiranje NV na notranjem obodu.

Modifikacija zbirala vključuje še dodatni zunanji kovinski obroč, ki omogoča skoncentriranje električnega polja v notranjem obroču, s tem pa se še poveča urejenost NV (30).

1.4 METODE ZA MERJENJE UREJENOSTI NANOVLAKEN

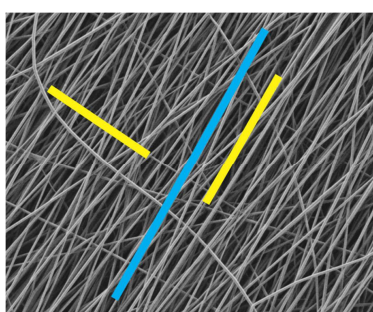
Naslednji korak, ki logično sledi izdelavi NV, je njihovo vrednotenje, in sicer določamo predvsem morfologijo in topografijo NV. V ta namen najpogosteje uporabljajo vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM, *ang. scanning electron microscopy*), ki temelji na analizi površine vzorca s tankim snopom elektronov, ter s tem omogoča njegovo vizualizacijo na nanometrskem nivoju. Po obsevanju površine z elektronskim snopom nastanejo zaradi interakcij z vzorcem sekundarni elektroni, ki se zberejo na detektorju in pretvorijo v signale o topografiji površine, kar vidimo kot črno belo fotografijo vzorca (31). Tako lahko iz analize SEM slike pridobimo informacije o povprečnem premeru, površini, obliki in poroznosti NV, pri tem pa je pomembno, da metode merjenja premerov, urejenosti NV, velikosti por itd. temeljijo na objektivnem in standardiziranem postopku, ki zagotavlja primerljivost podatkov.

Urejenost NV lahko neposredno določamo z delovanjem mehanske sile na vzorec in pri tem ocenjujemo prožnostni modul NV. Velja namreč, da so nanosi urejenih NV bolj elastični in prožni, zato lahko prenesejo večjo mehansko silo kot neurejena NV (24, 32).

Med vsemi do sedaj uporabljenimi metodami predstavlja določevanje urejenosti NV iz SEM slik najhitrejši in najenostavnejši način vrednotenja. Le-to zajema dva pristopa, in sicer merjenje kotov med NV in določeno navidezno linijo ter dvodimenzionalno hitro Fourierovo transformacijo (2D FFT) kot analizo urejenosti NV na podlagi oblike grafov, ki predstavljajo pretvorbo intenzitete sivin posameznih slikovnih točk (33).

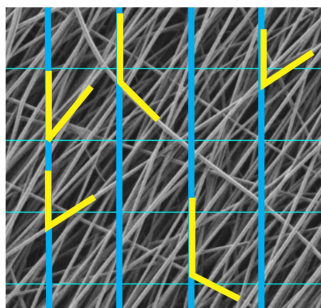
Merjenje kotov

Pri metodi merjenja kotov merimo kot med posameznim NV in navidezno postavljeno linijo, ki predstavlja referenčno linijo (slika 9) usmerjenosti NV v vzorcu ali pa poteka vertikalno glede na vzorec (slika 10).



Slika 9: Merjenje kotov (rumeni črti) glede na referenčno linijo (modra črta).

Pri merjenju z referenčno linijo usmerjenosti predstavljajo koti odklone od referenčne linije in v primerjavi z ostalimi postavitvami je ta princip najenostavnejši (8). Pri metodi merjenja kotov z vertikalno linijo pa je potrebno meritve, da so med seboj primerljive, še normalizirati. Slednje naredimo tako, da po izvedenih meritvah izračunamo povprečni kot, le-tega pa nato odštejemo od posameznih meritev, s tem pa dosežemo zmanjšanje vpliva razlik pri pripravi vzorcev za SEM analizo. Normalizirane vrednosti tako predstavljajo odklone od referenčne linije, ki je določena s povprečnim kotom (20).

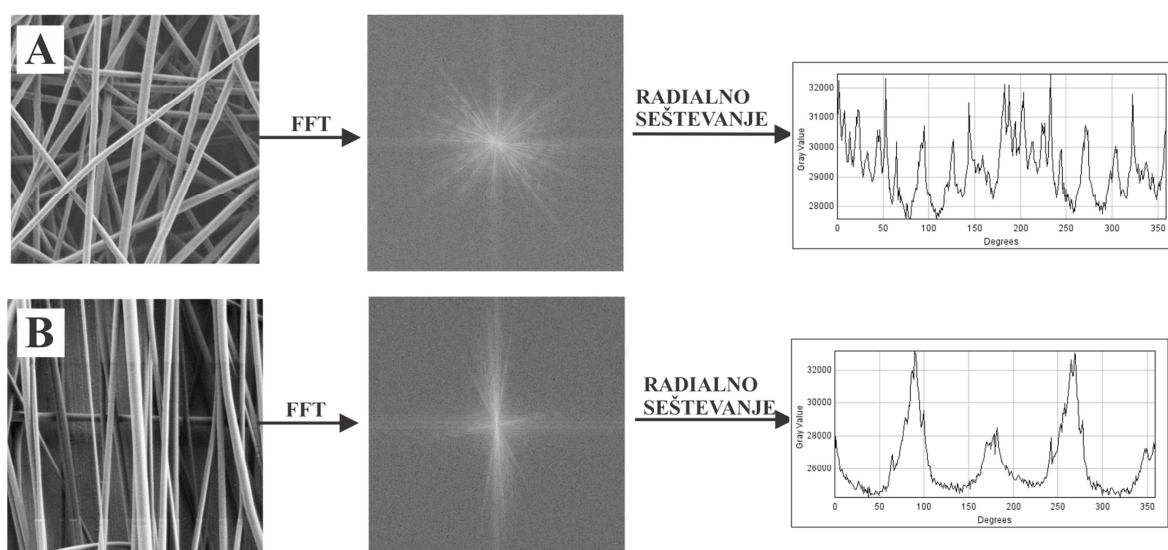


Slika 10: Merjenje kotov (rumene črte) glede na vertikalno linijo (modre črte).

Ne glede na uporabljeno metodo izvedene meritve vedno predstavimo v obliki histogramov, kjer 0° pomeni vzporednost NV z referenčno linijo, 90° pa pravokotnost NV z njo. Meritvam dodamo še različen predznak, negativen ali pozitiven, ki predstavlja razlike v usmerjenosti NV v levo ali desno smer. Pomembna informacija je na tem mestu še porazdelitev meritev histograma, pri čemer ozka porazdelitev pomeni urejenost, široka porazdelitev pa neurejenost NV (9, 20).

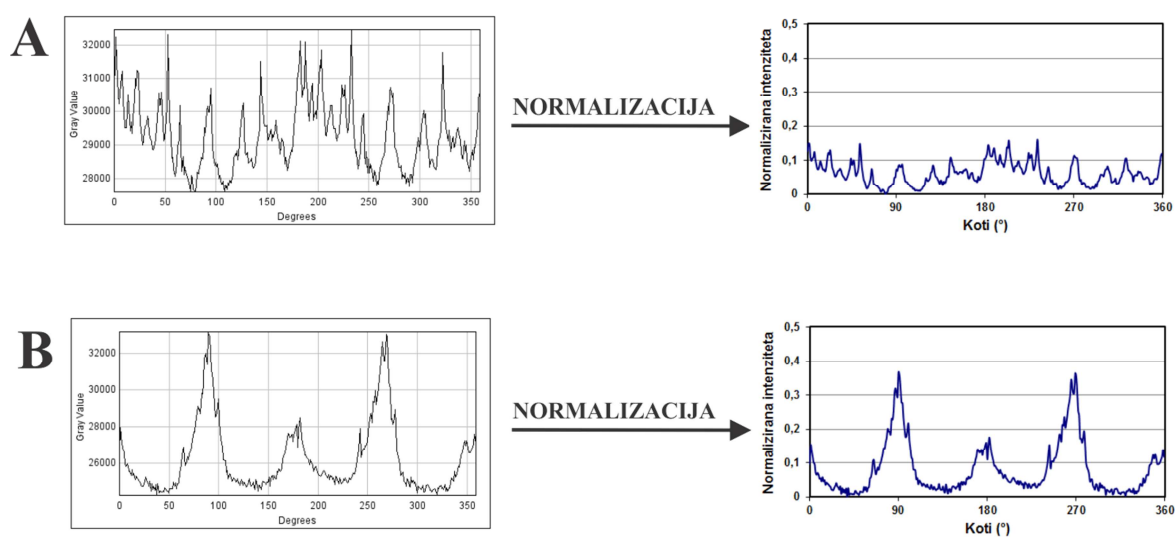
Metoda hitre Fourierove transformacije

Hitra Fourierova transformacija (*ang. Fast Fourier Transformation - FFT*) je algoritem, ki pretvarja razlike v intenziteti sivin slikovnih točk analizirane slike v frekvenčni grafični prikaz (slika 11). Za izvedbo FFT analize mora biti velikost slike 2^n (256 x 256, 512 x 512, 1024 x 1024 ...), barvni model v 8-bitnih sivinskih odtenkih (*ang. grayscale*), rezultat analize pa je frekvenčna porazdelitev slikovnih točk, kar lahko s pridom izkoristimo pri določevanju urejenosti NV. Področja SEM slike z enako intenziteto slikovnih točk se namreč s FFT pretvorijo v signale nizkih intenzitet, ki so zgoščeni na sredini FFT grafičnega prikaza. Po drugi strani pa so signali visokih intenzitet razporejeni na periferiji FFT grafičnega prikaza in predstavljajo razlike intenzitet slikovnih točk določenega področja. SEM slika neurejenih NV ima tako v FFT grafičnem prikazu na sredini zgoščene bele slikovne točke, ki so razporejene krožno simetrično, pri čemer je simetrična oblika porazdeljenosti posledica večjih predelov slikovnih točk z enako intenziteto (slika 11A). Nasprotno pa imajo urejena NV bele slikovne točke porazdeljene po določeni osi, saj so tudi slikovne točke enake intenzitete razporejene le v eni smeri (slika 11B).



Slika 11: Prikaz izvedbe FFT metode na neurejenih (A) in urejenih NV (B).

Za natančnejšo analizo urejenosti NV je v nadaljevanju potrebno dobljene frekvenčne grafične prikaze FFT pretvoriti v številčne vrednosti, ki jih lahko predstavimo v grafih. Pretvorba je možna s pomočjo funkcije radialnega seštevanja, ki omogoča seštevanje intenzitete slikovnih točk po krožnem prikazu (prav zaradi tega moramo tudi FFT grafični prikaz označiti v obliki kroga). Pred radialnim seštevanjem frekvenčne porazdelitve običajno poravnamo na vertikalno linijo, saj tako lažje primerjamo posamezne grafe, nato pa seštejemo intenzitete po posameznih kotih od 0 do 360°. Te vsote predstavimo v grafih, ki so simetrični zaradi radialnega seštevanja, le-te pa je še potrebno normalizirati zaradi razlik v osvetljenosti SEM slik, ki so posledica bodisi različne debeline nanosa NV bodisi nastavitvev SEM mikroskopa ali drugih dejavnikov, ki vplivajo na kontrast in svetlost SEM slik. Normalizacijo izvedemo tako, da graf vsot intenzitet premaknemo na x-os (slika 12), pri tem pa sprva določimo normalizacijski faktor. Slednjega izberemo med najnižjimi vrednostmi vsot intenzitet, nato pa posamezne vrednosti delimo z enakim faktorjem in od dobljene vrednosti odštejemo 1, da premaknemo graf bližje x-osi. Pozorni moramo biti, da ne izberemo prevelikega normalizacijskega faktorja, saj lahko s tem preveč znižamo višino vrha, ki kaže urejenost NV in tako dobimo napačne informacije o urejenosti. Normalizirane vrednosti predstavimo v grafu, stopnjo urejenosti NV pa razberemo iz oblike vrhov. Za neurejena NV so tako značilni skoraj enako visoki vrhovi, prisotni na vsakih 90° (slika 12A). Nasprotno pa so grafi urejenih NV asimetrični, in sicer z dvema večjima vrhova pri 90 in 270°, ki predstavljata urejenost NV ter dvema manjšima vrhova pri 0 in 180°, ki kažeta vplive ozadja (slika 12B). Visoka in ozka oblika večjih vrhov nakazuje na pojav urejenih NV, široki vrhovi pa prisotnost v več smereh urejenosti (33).



Slika 12: Prikaz normalizacije FFT metode neurejenih (A) in urejenih NV (B).

1.5 STATISTIČNA OBDELAVA

Pri raziskovalnem delu s statističnimi testi potrdimo ali ovržemo vpliv posameznih preučevanih dejavnikov na določeno spremenljivko, pri tem pa je izbira testov odvisna od lastnosti populacije vzorca, ki jo preiskujemo.

Enofaktorska analiza varianc

Enofaktorska analiza varianc (ANOVA) je statistični test, s katerim preverjamo enakost povprečij dveh ali več neodvisnih skupin. Pri statistični analizi dveh skupin lahko uporabimo t-test ali ANOVA, saj velja, da je t-test poseben primer ANOVA in daje enake rezultate. Pri medsebojni primerjavi večjega števila skupin z več t-testi pa bi prišlo do napake, zato je potrebno uporabiti ANOVA. Pred izvedbo testa ANOVA morajo biti izpolnjene naslednje predpostavke: i) odvisna spremenljivka je normalno porazdeljena glede na posamezen dejavnik, ki ga testiramo, ii) variance odvisne spremenljivke so enake pri vseh testiranih skupinah, iii) primeri predstavljajo naključne vzorce populacije in iv) testirane spremenljivke so med seboj neodvisne. Pri neenakih variancah testiranih skupin sta testa Welch in Brown-Forsythe zaradi večje robustnosti ustrezni alternativni testu ANOVA.

ANOVA test izvedemo tako, da postavimo ničelno in alternativno hipotezo, določimo mejo signifikantnosti α (večinoma je postavljena na 0,05), izračunamo vsote kvadratov, prostostne stopnje, srednje kvadrate ali variance. Iz razmerja varianc dobimo testno statistiko F, ki jo primerjamo z vrednostjo iz tabele F distribucije in ocenimo signifikantnost. Statistični programi kot rezultat obdelave poleg izračunanih vrednosti posameznih korakov ANOVA podajo vrednost p, ki predstavlja najmanjšo stopnjo signifikantnosti, pri kateri še lahko zavrnilo ničelno hipotezo. Pri statistikah enakih ali večjih od tabelarne vrednosti oziroma $p < 0,05$ ovržemo ničelno hipotezo, kar pomeni, da se primerjane skupine med seboj razlikujejo. Če je izračunana statistika manjša od tabelarne vrednosti oziroma $p > 0,05$, ničelne hipoteze ne moremo zavrniti. S statističnim testom ANOVA torej lahko potrdimo le, da obstaja razlika med primerjanimi skupinami, za natančnejšo informacijo, katere skupine se razlikujejo, pa uporabimo post hoc teste. Pogosto se uporablja Tukey-ev test, saj med seboj primerja vse kombinacije testiranih skupin, velikost skupin je lahko neenakomerna, verjetnost napačno določene razlike je manjša od α , vendar pa ga lahko uporabimo le pri enakih variancah. Pri neenakih variancah

predstavlja Games-Howellov test ustrezno alternativo za iskanje razlik med testiranimi skupinami (34, 35).

1.6 POLIVINILALKOHOL

Polivinilalkohol (PVA) je vodotopni sintezni polimer z molekulsko maso 20 000-200 000 g/mol. Nahaja se v obliki granularnega praška, ki je bele do kremaste barve in brez vonja. Pridobivajo ga z delno ali popolno hidrolizo polivinilacetata in je lahko različnih stopenj polimerizacije. Tako stopnja polimerizacije kot stopnja hidrolize vplivata na fizikalno-kemijske lastnosti PVA, in sicer zviševanje obeh stopenj zmanjšuje topnost polimera v vodi in otežuje njegovo kristalizacijo (36, 37).

PVA se v farmaciji uporablja kot pomožna snov za oblaganje tablet, stabilizator emulzij in zgoščevalec, v biomedicini pa predvsem za izdelavo mehkih kontaktnih leč, vsadkov in umetnih organov (36, 38). Zaradi biokompatibilnosti, netoksičnosti, nekancerogenosti, zmožnosti nabrekanja in bioadhezivnih lastnosti je PVA polimer izbire kot biomaterial. Ker so se v vodnem okolju različni dostavni sistemi iz PVA (filmi, hidrogeli, NV) izkazali za precej nestabilne, se za povečanje njihove stabilnosti poslužujejo različnih tehnik premreževanja in tvorbe kopolimerov (38, 39).

PVA je eden izmed prvih polimerov, iz katerega so pripravili NV, še danes pa se ga na biomedicinskem področju pogosto uporablja za razvoj NV za tkivne nadomestke, sodobne obloge za rane in kot sistemi za dostavo učinkovin. Tako so na primer znani poskusi izdelave ogrodja iz NV PVA, kolagena in nanodelcev hidroksiapatita, ki bi po sestavi in zgradbi posnemalo kostno ogrodje (40). Prav tako PVA NV pri raziskovanju sodobnih oblog za celjenje ran izkazuje velik potencial, saj s porozno strukturo posnemajo strukturo ECM, usmerjajo migracijo celic in spodbujajo njihovo aktivnost, omogočajo absorpcijo izločkov rane, izmenjavo plinov in hranil ter vključevanje različnih učinkovin (antibiotikov, nesteroidnih antirevmatikov), ki pospešujejo celjenje. Ugotovili so tudi, da vključevanje drugih polimerov (polivinilacetat) in nanodelcev v NV podaljša sproščanje učinkovin do več dni (39, 41, 42). Poleg uporabe NV iz PVA kot dostavnih sistemov za podaljšano sproščanje so takšna NV uporabna tudi kot hitro disperzibilni sistemi, saj zaradi njihovega hitrega nabrekanja in raztapljanja takoj sprostijo zdravilno učinkovino (43).

2 NAMEN DELA

Podrobnejše poznavanje procesa izdelave in raziskovanje potencialne uporabe NV je vplivalo na razvoj modifikacij osnovnega procesa elektrostatskega sukanja za izdelavo NV z želenimi lastnostmi. Tako se je poleg iskanja optimalnih pogojev za izdelavo NV iz različnih polimerov in preučevanjem njihove morfologije izkazala kot izrednega pomena urejenost oziroma usmerjenost izdelanih NV. To je še posebej pomembno za področje biomedicine, saj NV posnemajo strukturo ECM visoko urejenih tkiv in v primerjavi z naključno urejenimi NV omogočajo hitrejšo in usmerjeno razrast celic.

Namen diplomske naloge bo izdelati urejena NV iz PVA z metodo elektrostatskega sukanja. V ta namen bomo za zbiranje NV uporabili vrteče zbiralo v obliki bobna, ki smo ga sami zasnovali na Fakulteti za farmacijo. V procesu izdelave bomo sistematično in natančno spreminjali pogoje elektrostatskega sukanja, in sicer koncentracijo polimera, uporabljeno napetost, razdaljo med iglo in zbiralom ter hitrost vrtenja zbirala, pripravljena vlakna pa ovrednotili s pomočjo slik, ki jih bomo posneli z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Glavni cilj bo podrobno preučiti vpliv posameznih parametrov na urejenost in morfologijo vlaken z namenom določevanja optimalnih pogojev za nastanek gladkih urejenih NV, orientiranih v samo eno smer. Pri vrednotenju urejenosti bomo raziskali dve objektivni metodi iz literature, ki temeljita na vrednotenju slik izdelanih s SEM, ju modificirali za naše vzorce ter kritično ocenili njuno uporabnost. Ugotovitve vplivov posameznih pogojev elektrostatskega sukanja bomo podkrepili še s statistično analizo. V zadnjem delu bomo kritično ocenili dobljene rezultate in predlagali možnosti optimizacije izdelanih NV za potencialno uporabo v biomedicini.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

Reagenti za pripravo polimerne raztopine za elektrostatsko sukanje:

- polivinilalkohol Mowiol 20-98[®], $M_r = 125\,000$ g/mol, stopnja hidrolize 98,0-98,8%, stopnja polimerizacije 2800, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- prečiščena voda

3.2 NAPRAVE

Priprava polimerne raztopine:

- digitalna tehna, Vibra AJ-2200 CE, Japonska
- magnetno mešalo

Izdelava urejenih nanovlaken:

- generator visoke napetosti, Linari Engineering, Italija
- črpalka, Razel TM, R99, Italija
- 20 ml brizgalke za enkratno uporabo, Omnifix[®], B. Braun
- kovinska igla z notranjim premerom 0,8 mm, Linari Engineering, Italija
- vrteče zbiralo v obliki bobna, Systro Eiterfeld
- aluminijasta folija širine 12 cm, Roial, Italija
- nevidni lepilni trak, Scotch Magic, 3M, Francija
- merilec temperature in vlage, ISOLAB Laborgeräte GmbH, Nemčija

Vrednotenje nanovlaken:

- obojestranski prevodni lepilni trak, premer 12 mm, Oxon, Oxford instruments, Velika Britanija
- vrstični elektronski mikroskop z visoko ločljivostjo (SEM), Carl Zeiss, model SUPRA 35 VP, Oberkochen, Nemčija
- računalniški program ImageJ 1.45s, Image Processing and Analyzing in Java, NIM, ZDA
- računalniški program SPSS Statistics 17.0, IBM, ZDA

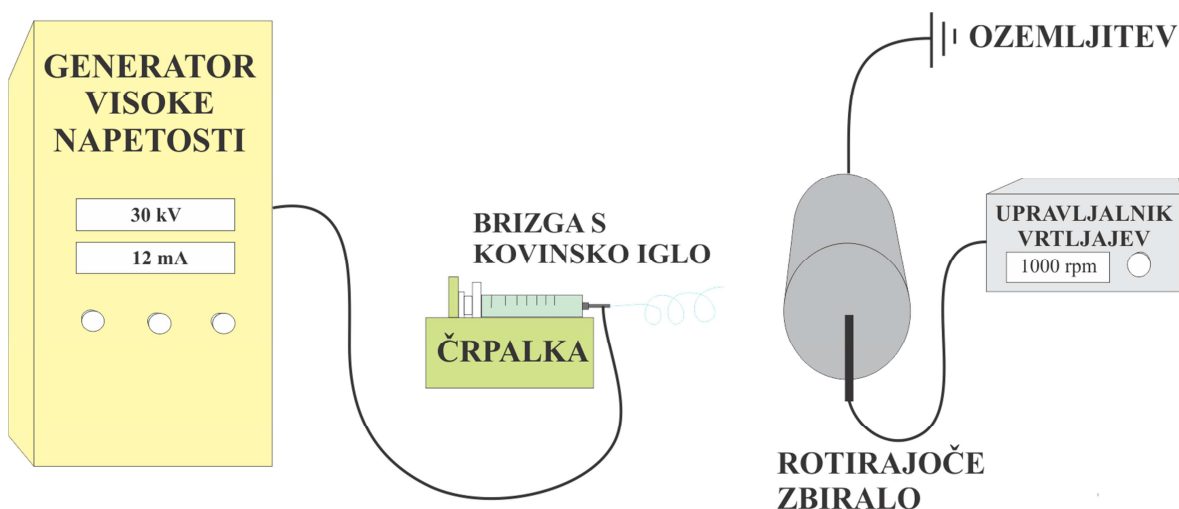
3.3 POSTOPKI IN METODE

Priprava raztopin polivinilalkohola

Za pripravo 8%, 10% in 12% (m/m) PVA raztopin smo natehtali preračunano količino polimera in ga dodajali ustrezni količini prečiščene vode v stekleni časi. Raztopino smo ob konstantnem mešanju na magnetnem mešalu segrevali pri približno 90 °C, dokler se polimer ni v celoti raztopil, pri tem pa je bil čas segrevanja odvisen od vsebnosti PVA (od 2 do 4 ure). Pri tem velja izpostaviti zanimivo dejstvo, da smo raztopine z večjo vsebnostjo PVA morali segrevati krajši čas, saj se je PVA raztopil hitreje. Bistro raztopino PVA smo nato postopoma ohladili, pri tem pazili, da na površini ni nastal polimeren film, dodali prečiščeno vodo, ki je med segrevanjem izparela, ter pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi, da smo dobili raztopino v ravnotežju s popolno hidratacijo polimera.

Izdelava urejenih nanovlaken

Urejena nanovlakna smo izdelali z metodo elektrostatskega sukanja ob uporabi vrtečega zbirala v obliki bobna s premerom 12 cm (slika 13). Plastično brizgo s kovinsko iglo smo napolnili s približno 6 ml raztopine PVA in pri tem pazili, da je v brizgi ostalo čim manj zračnih mehurčkov. Brizgo smo vpeli v črpalko in nastavili konstanten pretok 0,637 ml/h. Tak pretok se je namreč v predhodno opravljenih študijah o PVA nanovlaknih na Fakulteti za farmacijo izkazal za optimalnega. Kovinsko iglo smo povezali z generatorjem visoke napetosti, na vrteče zbiralo z lepilnim trakom pritrdili aluminijasto folijo, tako da je ostala nepoškodovana tudi pri višjih obratih, ter zbiralo ozemljili (slika 14).



Slika 13: Shema naprave za elektrostatsko sukanje.



Slika 14: Generator visoke napetosti (A), plastična brizga s kovinsko iglo, vpeta v črpalko (B) in vrteče zbiralo (C).

Z namenom ovrednotiti vpliv posameznih procesnih parametrov (koncentracije, napetosti, obratov ter razdalje med kovinsko iglo in zbiralom) na izdelavo NV, smo pogoje elektrostatskega sukanja sistematično spreminjali, in sicer smo NV izdelali pri:

- koncentracijah: 8, 10, 12% (m/m) PVA,
- napetostih: 10, 15, 20, 25, 30 kV,
- obratih: 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 rpm in
- razdaljah med kovinsko iglo in zbiralom: 10, 15, 20 cm.

V vseh primerih je bil čas elektrostatskega sukanja 15 minut, kar je več kot zadostovalo za pridobitev zadostne količine vzorca za nadaljnje analize, med izdelavo pa smo spremljali tudi temperaturo in vlažnost zraka ter nihanje električnega toka.

Vrednotenje nanovlaken

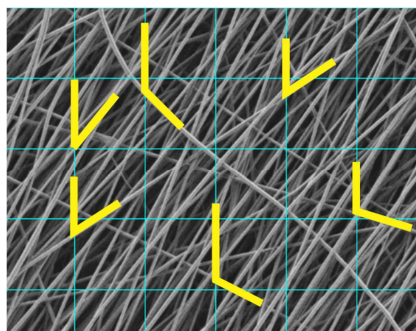
Izdelana NV smo pripravili za analizo z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (Supra 35 VP, Carl Zeiss, Oberkochen, Nemčija), kar smo storili tako, da smo vzorce NV velikosti približno 0,5 x 0,5 cm izrezali iz sredine folije in jih s prevodnim obojestranskim lepilom prilepili na nosilce za SEM, jih vstavili posamično v SEM, nato pa jih pogledali pri pospeševalni napetosti 1 kV in z uporabo sekundarnega detektorja.

Merjenje premerov nanovlaken

Dobljene SEM slike NV smo analizirali z računalniškim programom ImageJ 1.45s (ImageJ 1.45s software, NIH, ZDA), pri čemer smo povprečne premere izdelanih NV določali tako, da smo 50-im naključno izbranim NV pri 50.000 x povečavi izmerili premer.

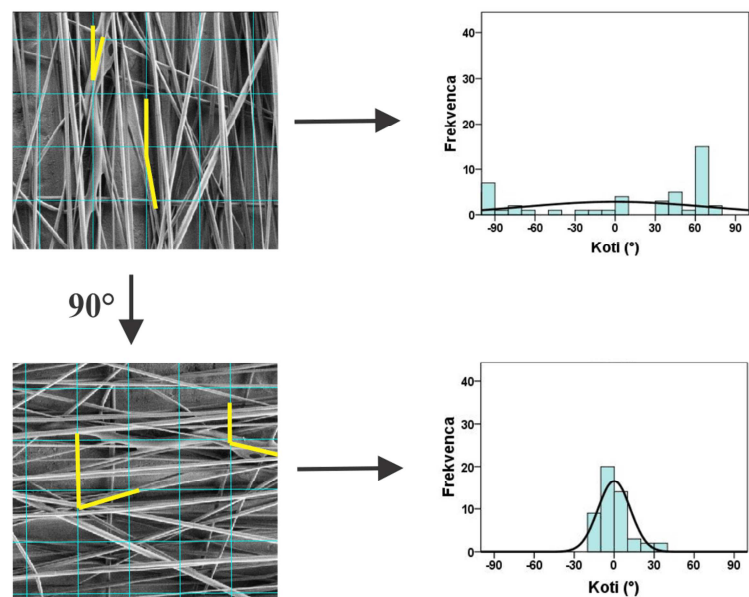
Določanje urejenosti nanovlaken

Urejenost NV smo vrednotili z dvema objektivnima metodama, in sicer merjenjem kotov in metodo FFT. Meritev kotov je potekala tako, da smo na SEM sliko 10.000 x povečave najprej vstavili navidezno mrežo ter izmerili kot na stičišču vertikalne linije in posameznega NV. Pri vseh meritvah je bil krak kota, ki ga je določalo NV, na desni strani, saj smo s tem razlikovali NV, ki so križala večino NV (slika 15). Tudi tukaj smo na vsaki sliki izmerili približno 50 različnih kotov naključno izbranih NV.



Slika 15: Primer merjenja kotov.

Usmerjenost NV smo v nadaljevanju normalizirali tako, da smo od posamezne meritve odšteli povprečni kot. Z normalizacijo smo pridobili informacije o odklonih posameznih NV od povprečnega kota NV, s tem pa zmanjšali razlike pri nanosu NV na folijo, pripravi vzorcev za SEM analizo in snemanju SEM slik. Merjenje kotov pri vertikalno urejenih NV je bilo po opisanem postopku oteženo in opazili smo bimodalne porazdelitve kotov, kar je kazalo na neurejena NV, čeprav je bila na SEM slikah vidna dokaj visoka urejenost. Različna stičišča NV z vertikalno mrežo se odražajo kot izredno majhni koti, ki jih je težko natančno izmeriti, in veliki koti zaradi NV, ki križajo glavno usmerjenost. Zaradi tega smo metodo modificirali tako, da smo pred meritvami kotov SEM sliko obrnili za 90° (slika 16), s tem pa smo lahko natančneje izmerili posamezne kote in zmanjšali razlike zaradi križanja NV.



Slika 16: Razlike pred (zgoraj) in po (spodaj) modifikaciji merjenja kotov.

Pri FFT metodi smo uporabili SEM slike z 2000 x povečavo, da bi z analizo zajeli čim večjo površino nanosa NV. Slike smo obrezali na velikost 512 x 512 slikovnih pik, da smo dobili največji kvadrat, in izvedli FFT analizo. Kot rezultat smo dobili frekvenčne domene, ki smo jih s pomočjo vtičnika Oval Profile s funkcijo radialnega seštevanja pretvorili v grafe.

Za lažjo primerjavo smo posamezne grafe normalizirali po enačbi 1, kjer N predstavlja normalizirano vrednost, y je posamezna vrednost grafa in $y_{\min}$ je minimalna vrednost grafa.

$$N = \frac{y}{y_{\min}} - 1$$

Enačba 1: Formula normalizacije FFT metode.

Statistična obdelava podatkov

Dobljene podatke smo obdelali v računalniškem programu SPSS Statistics 17.0, pri tem pa smo statistično signifikantnost posameznih parametrov preverjali glede na homogenost varianc potrjeno z Levenovim testom. Pri enakih variancah skupin smo uporabili test ANOVA, za post hoc analizo pa test Tukey; pri neenakih variancah pa testa Welch in Brown-Forsythe ter test Games-Howell za post hoc analizo. Statistično signifikantne razlike pri vseh testih smo potrdili pri $p < 0,05$ (slika 17).

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

Premeri

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,688	2	2185	,503

ANOVA

Premeri

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,004	2	,002	,281	,755
Within Groups	17,405	2185	,008		
Total	17,410	2187			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Premeri

	(I) Obrati	(J) Obrati	Mean Difference (I-J)			Sig.
			Mean Difference (I-J)	Std. Error		
Tukey HSD	1000	3000	,0011937	,0046910		,965
		6000	,0034405	,0046672		,741
	3000	1000	-,0011937	,0046910		,965
		6000	,0022468	,0046639		,880
	6000	1000	-,0034405	,0046672		,741
		3000	-,0022468	,0046639		,880

Slika 17: Primer izpisa statistike iz SPSS. Z rdečo so označene statistične vrednosti p.

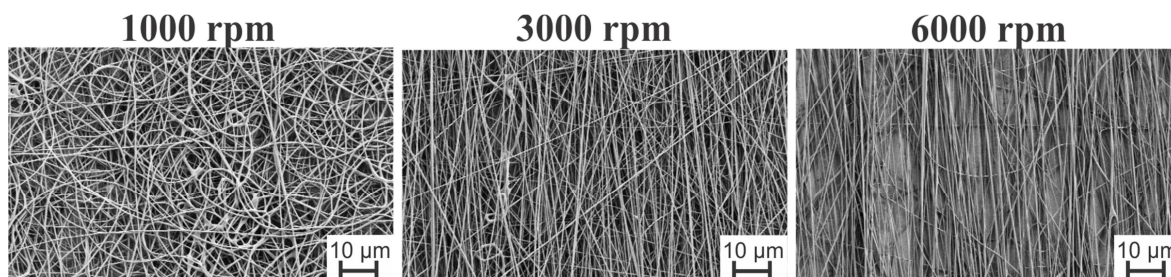
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VREDNOTENJE MORFOLOGIJE IZDELANIH NANOVLAKEN

Za izdelavo urejenih NV smo uporabili vodne raztopine PVA koncentracij 8, 10 in 12 % (m/m), saj so NV iz teh v predhodnih raziskavah na Fakulteti za farmacijo že bila uspešno pripravljena. Elektrostatsko sukanje smo izvedli pri različnih napetostih, razdalji med iglo in zbiralom ter pri različnih obratih zbiral, pri čemer pa je bil pretok polimerne raztopine skozi iglo konstanten. S sistematičnem spreminjanjem posameznih procesnih pogojev smo namreč želeli zajeti in preučiti čim širši vpliv posameznega faktorja na izdelana NV. Za vrednotenje morfologije dobljenega produkta smo izbrali objektivno grafično metodo - SEM, ki ne poškoduje vzorca. SEM slike smo ocenili kvalitativno, tako da smo preverili obliko NV in prisotnost anomalij, kot so na primer vozli in kaplje polimera, ter njihovo pogostost pojavljanja pri posameznih pogojih.

Vpliv obratov

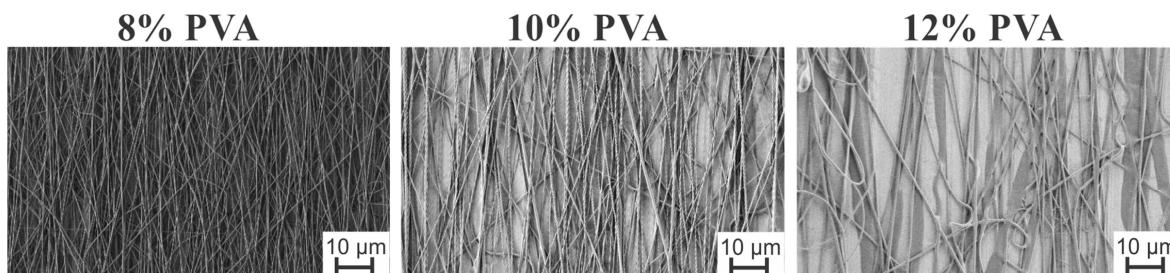
Slika 18 prikazuje morfologijo NV, ki smo jim pri izdelavi spreminjali le hitrost vrtenja zbiral, vsi ostali pogoji elektrostatskega sukanja pa so bili konstantni. Jasno lahko vidimo, da urejenost NV narašča s povečevanjem obratov, saj so pri nizkih obratih NV imela še zavoje in bila naključno odložena na zbiral, z naraščanjem obratov pa so se izravнала in poravnala le v eni smeri.



Slika 18: SEM slike NV pri različnih obratih, 10% PVA, 15 cm in 25 kV.

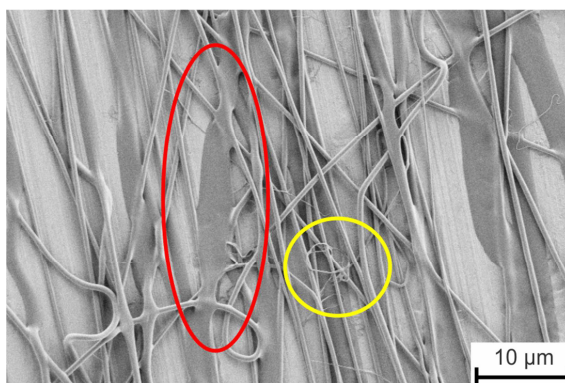
Vpliv koncentracije

Slika 19 kaže spreminjanje NV pri različnih uporabljenih koncentracijah PVA. Ugotovili smo, da je debelina nanosa zbranih NV na aluminijasti foliji padala z zviševanjem koncentracije PVA, kar pripisujemo dejstvu, da se je kovinska igla med izdelavo NV večkrat zamašila zaradi večje viskoznosti raztopin.



Slika 19: SEM slike NV pri različnih koncentracijah, 15 kV, 15 cm in 6000 rpm.

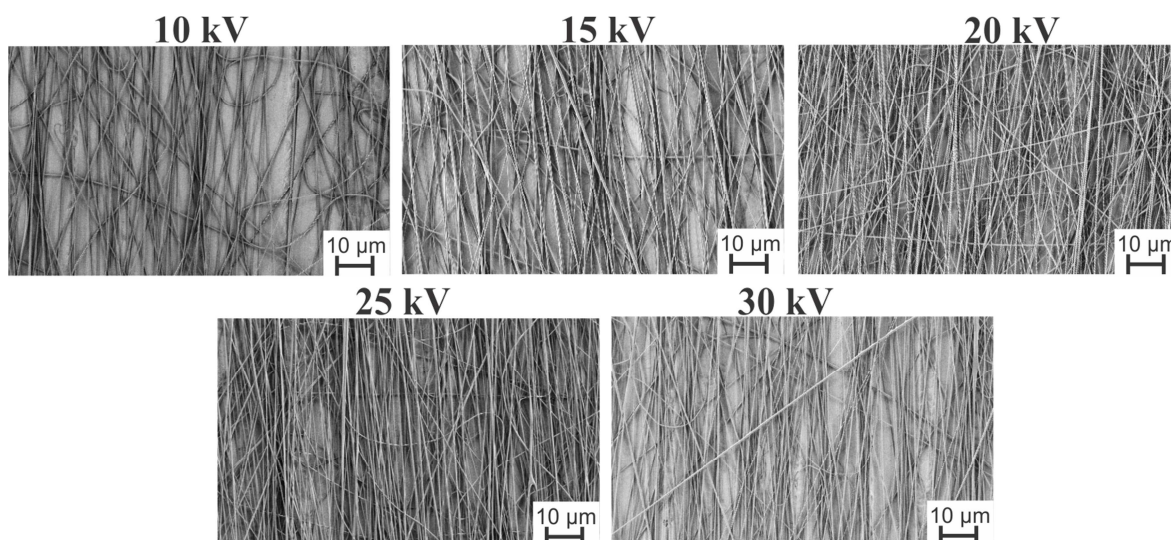
Dodatno smo pri 12% PVA opazili tudi več morfoloških anomalij NV. Pojavila so se sploščena in razvejana NV (slika 20). Prva nastanejo pri polimernih raztopinah z večjo viskoznostjo, saj ta upočasni izhlapevanje topila med potovanjem curka do zbirala in zato še nepopolnoma posušena NV prispejo do zbirala, kjer se ob trku sploščijo (15, 44). Opažena razvejana NV pa so posledica cepitve curka med elektrostatskim sukanjem kot rezultat skupnega delovanja sil zaradi aplicirane električne napetosti in površinske napetosti raztopin (15).



Slika 20: Sploščeno NV (rdeča obroba) in razvejano NV (rumena obroba) pri 12% PVA, 15 cm, 15 kV in 6000 rpm.

Vpliv napetosti

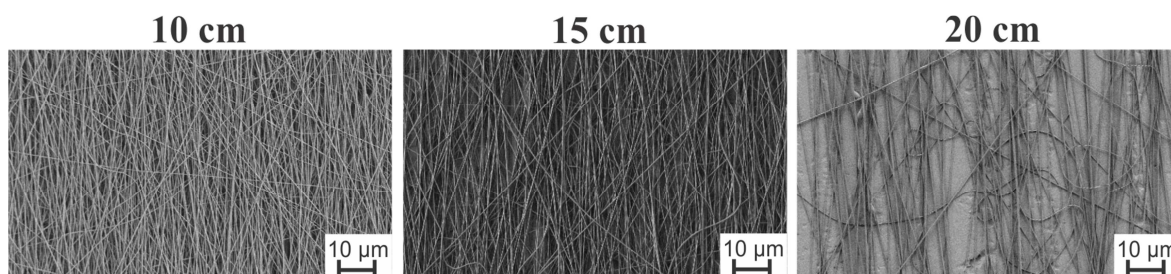
Slika 21 prikazuje izdelana NV pri različnih napetostih. Pri nizkih napetostih smo opazili več zavojev NV, ki pa so se z večanjem napetosti odpravili, pri najvišji napetosti pa smo neurejena NV opazili predvsem v zgornji plasti nanosa. Raziskave so pokazale, da se zavoji NV pojavljajo zaradi nestabilnosti curka NV pri pritrdjevanju na zbiralo zaradi vedno višjih vnesenih elektrostatskih sil (15).



Slika 21: SEM slike NV pri različnih napetostih, 10% PVA, 15 cm in 6000 rpm.

Vpliv razdalje

Slika 22 prikazuje spreminjanje NV pri različnih razdaljah. Vidimo, da se z večanjem razdalje nanosi tanjšajo in so redkeje prepleteni; razlike v debelini, širini in kompaktnosti nanosa NV na aluminijski foliji pa smo opazili tudi že s prostim očesom med samo izdelavo. Tako smo pri razdalji 10 cm dobili ozke (do 3 cm), goste in kompaktne nanose, pri 20 cm so bila NV najbolj krhka, v širokih (več kot 12 cm) in redkih plasteh.



Slika 22: SEM slike NV pri različnih razdaljah, 8% PVA, 15 kV in 6000 rpm.

Poleg tega smo opazili tudi pogostejše pojavljanje zlitih NV pri 10 cm, kar pa pripisujemo nezadostnemu izhlapevanju topila pred pritrditvijo na zbiralno zaradi prekratke razdalje (15).

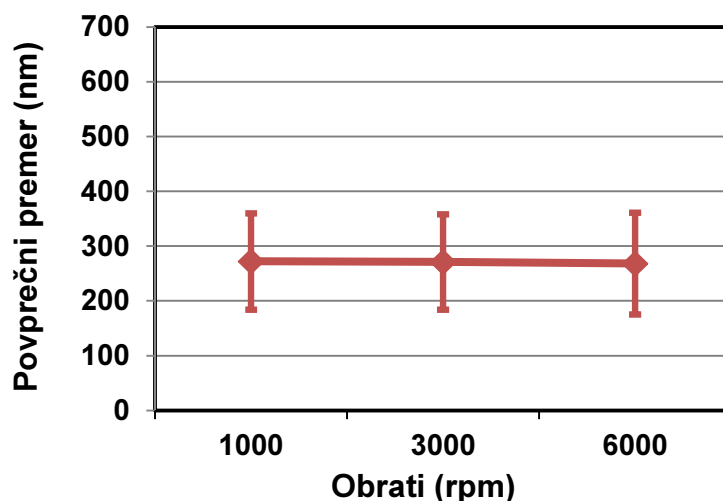
4.2 VREDNOTENJE PREMERA NANOVLAKEN

Po kvalitativnem pregledu izdelanih NV smo na SEM slikah opravili tudi kvantitativne analize, tako da smo izmerili premere NV in iz dobljenih rezultatov ocenili vplive posameznih pogojev elektrostatskega sukanja, ugotovitve pa tudi statistično analizirali in ovrednotili njihovo signifikantnost.

Premeri vseh izmerjenih NV so bili med 150 in 700 nm, pri čemer pa je bil povprečni premer 300 nm. NV z najmanjšim premerom smo izmerili pri 8% PVA, 15 cm, 30 kV, 6000 rpm, največji premer pa so imela NV pri 12% PVA, 15 cm, 10 kV, 6000 rpm.

Vpliv obratov

Vpliv hitrosti vrtenja zbirala na povprečni premer NV smo določali pri koncentraciji 10% PVA, saj je ta raztopina glede na postavitev našega dela predstavljala sredino uporabljenih koncentracij, poleg tega pa je tudi v drugih študijah pogosto uporabljena pri izdelavi NV. Graf 1 tako prikazuje spreminjanje premera NV v odvisnosti od obratov, kjer lahko vidimo, da se povprečni premeri in standardne deviacije ne glede na uporabljene pogoje ne razlikujejo, kar smo tudi statistično dokazali s testom ANOVA ($p > 0,05$). Hitrost vrtenja zbirala torej na premer NV ne vpliva, bistveno pa vpliva na njihovo urejenost, kar je tudi v skladu z že objavljenimi študijami (23, 24, 25).

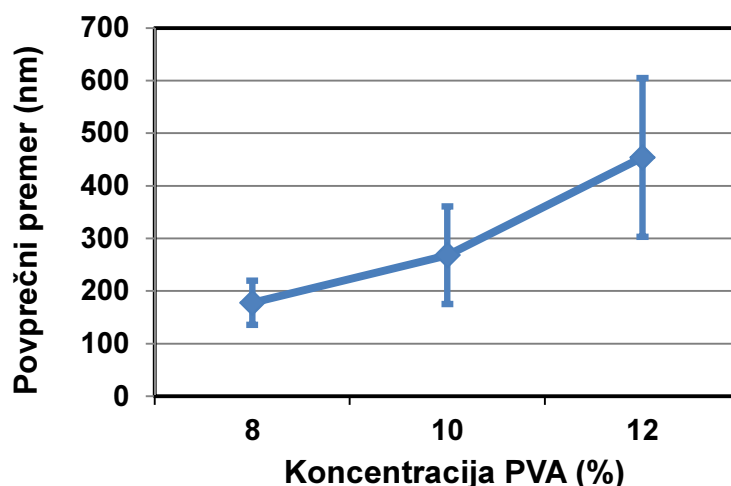


Graf 1: Vpliv obratov na povprečni premer NV pri 10% PVA.

Glede na to ugotovljeno dejstvo smo vse nadaljnje analize vplivov posameznih pogojev na elektrostatsko sukanje urejenih NV izvedli s podatki, pridobljenimi pri 6000 rpm, saj so pri teh obratih nastala NV, ki so bila najbolj urejena, ravna in z najmanj anomalijami, kar je bil tudi cilj našega dela.

Vpliv koncentracije

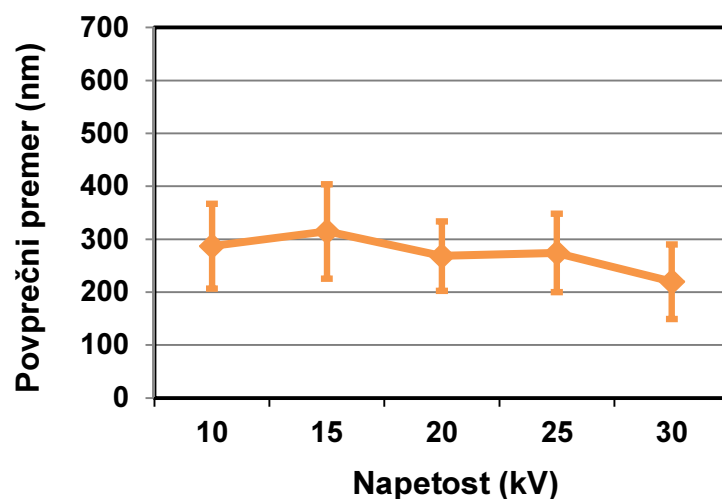
Graf 2 prikazuje povprečni premer urejenih NV v odvisnosti od koncentracije PVA. Jasno lahko vidimo, da se z višanjem koncentracije premer NV in njegova standardna deviacija povečata. Z višanjem koncentracije polimera se zaradi večjega prepletanja polimernih verig poveča tudi viskoznost raztopine polimera, kar povzroči nastanek stabilnejšega curka, ki se upira raztegovanju in tanjšanju zaradi delovanja elektrostatskih sil, in posledično tako ostanejo NV z večjimi premeri (15). Večje standardne deviacije pri najvišji koncentraciji pripisujemo cepitvi curka, ki povzroči nastanek različno debelih NV. Razlike med povprečnimi premeri pri različnih koncentracijah so tudi signifikantne, kar smo statistično potrdili s testom ANOVA ($p < 0,05$).



Graf 2: Vpliv koncentracije PVA na povprečni premer NV pri 6000 rpm.

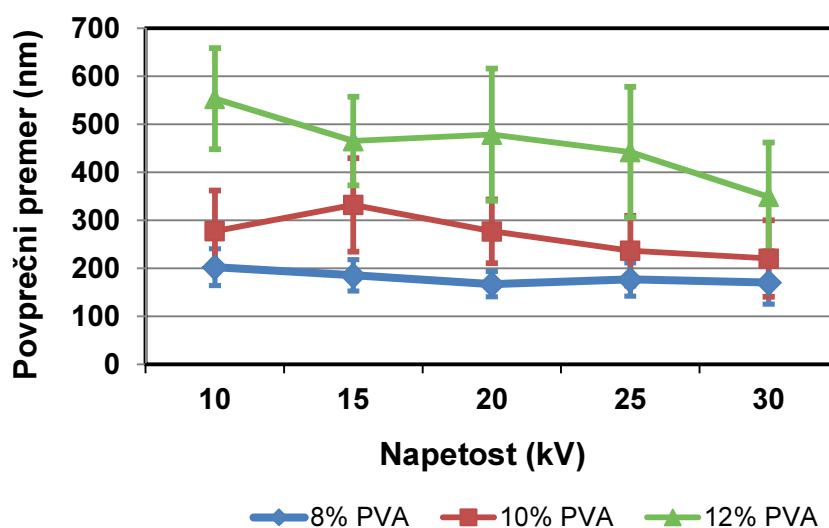
Vpliv napetosti

Graf 3 prikazuje odvisnost povprečnega premera od uporabljene napetosti pri 10% PVA. Rezultati so pokazali, da povečevanje napetosti povzroči nastanek NV z manjšim premerom, in to ne glede na ostale pogoje elektrostatskega sukanja, pri tem pa se tudi standardne deviacije bistveno ne razlikujejo med seboj. Razlikovanje premerov smo tudi statistično potrdili ($p < 0,05$). Zmanjševanje premera NV z večanjem napetosti je odraz vedno večjega delovanja elektrostatskih sil v curku, ki povzročijo njegovo podaljševanje in s tem nastanek tanjših NV (15).



Graf 3: Vpliv napetosti na povprečni premer NV pri 10% PVA.

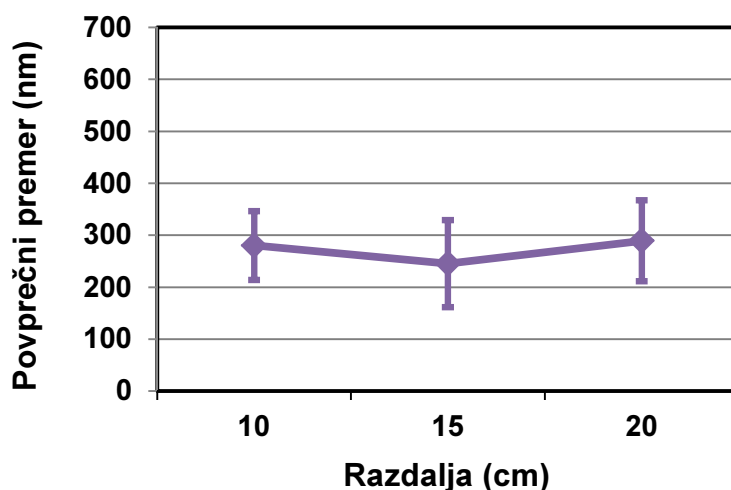
V nadaljevanju smo izvedli podrobnejšo analizo spreminjanja premera v odvisnosti od napetosti za vsako uporabljeno koncentracijo PVA posebej pri 6000 rpm, kar prikazuje graf 4. Ugotovili smo, da spreminjanje napetosti pri 8% PVA ne kaže večjih razlik med povprečnimi premeri, tudi standardne deviacije so precej majhne. Pri 10% PVA se pojavi anomalija pri 15 kV, kjer je povprečen premer največji, vendar pa se premer z nadaljnjim večanjem napetosti manjša. Standardne deviacije so v tem primeru že nekoliko večje kot pri 8% PVA. Trend upadanja premera z večanjem napetosti je najbolj viden pri 12% PVA, kjer so tudi večje standardne deviacije, kar pa je ponovno posledica večjega delovanja sil in cepitve curka pri višjih napetostih (15).



Graf 4: Vpliv napetosti na povprečni premer NV pri različnih koncentracijah in 6000 rpm.

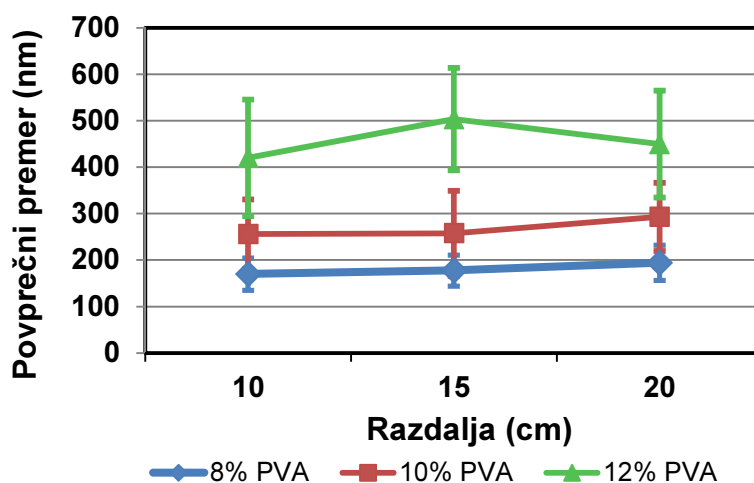
Vpliv razdalje med kovinsko iglo in zbiralom

Graf 5 prikazuje povprečni premer NV pri različnih uporabljenih razdaljah in 10% PVA. Vidimo lahko, da se s povečevanjem razdalje premer NV in standardna deviacija skoraj ne spreminjata, kljub temu pa so se povprečni premeri pri 15 cm statistično signifikantno ($p < 0,05$) razlikovali od povprečnih premerov pri 10 in 20 cm, med katerimi nismo dokazali razlik ($p > 0,05$).



Graf 5: Vpliv razdalje na povprečni premer NV pri 10% PVA.

Če spreminjanje premera glede na razdaljo pogledamo podrobneje ob upoštevanju različnih koncentracij in 6000 rpm (graf 6), ugotovimo, da v splošnem res ni prišlo do sprememb povprečnih premerov in standardnih deviacij, kljub temu pa lahko opazimo odstopanja pri razdalji 15 cm. Na tem mestu smo namreč pri koncentraciji 10% PVA opazili zmanjšanje in pri 12% PVA povečanje povprečnega premera NV, smo pa v obeh primerih še zmeraj znotraj standardnih deviacij ostalih rezultatov.



Graf 6: Vpliv razdalje na povprečni premer NV pri različnih koncentracijah in 6000rpm.

4.3 VREDNOTENJE UREJENOSTI NANOVLAKEN

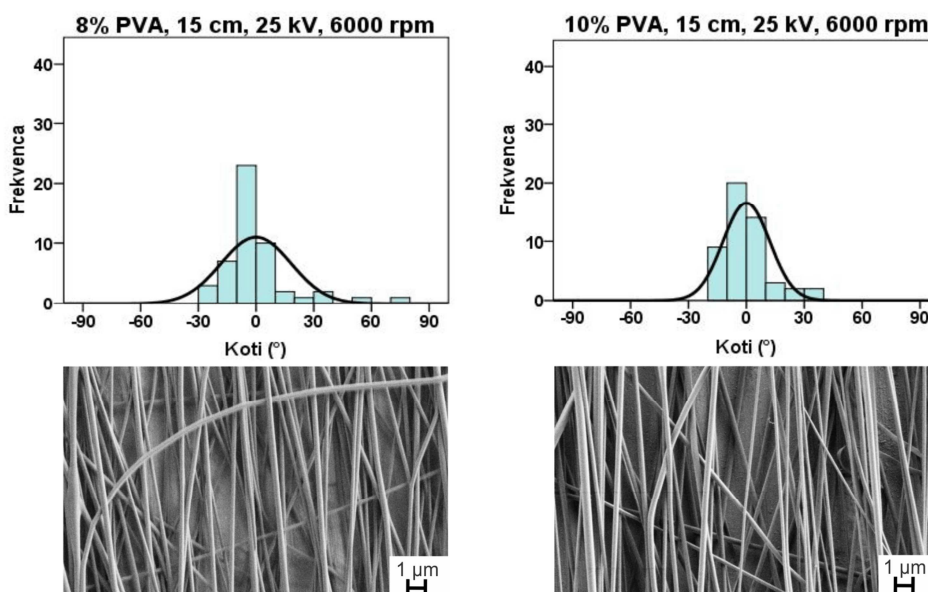
Urejenost smo definirali kot orientiranost NV le v eni smeri, pri čemer smo težili k izdelavi čim bolj vzporedno usmerjenih NV. Čeprav je urejenost NV jasno razvidna že iz same SEM slike, smo za racionalno vrednotenje le-te uporabili objektivne grafične metode, povzete iz literature, ki smo jih za naš primer še nekoliko modificirali.

Vrednotenje urejenosti z metodo merjenja kotov

Merjenje kotov je sicer precej enostaven postopek, ki pa zahteva veliko natančnost. Dodatno je postopek tudi časovno potraten, saj moramo za reprezentativnost rezultatov izmeriti veliko število kotov na eni sliki. Metoda je uporabna pri vrednotenju vzorcev z različno stopnjo urejenosti, rezultate pa predstavimo v obliki histograma. Pri tem bolj urejena NV dajejo ožje porazdelitve kotov v histogramu, modifikacija tehnike pa je potrebna v primeru, ko so NV vzporedna z vertikalnimi linijami in ne tvorijo stičišč, zato merjenje kotov ni izvedljivo, oziroma ko imajo NV majhne odklone od vertikalne linije, ki jih ne moremo natančno izmeriti.

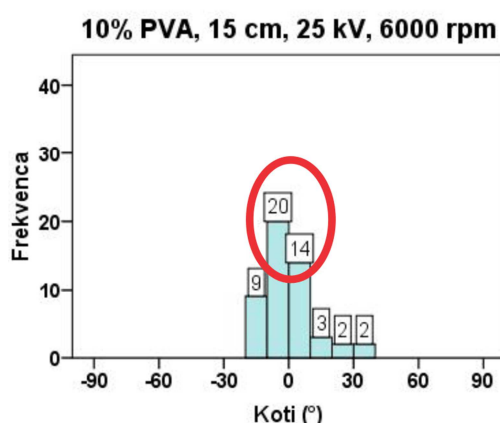
Urejenost NV smo vrednotili pri 10.000 x povečavi, saj smo pri tej zagotovili dovolj natančne meritve.

Na sliki 23 sta prikazana histograma porazdelitev odklonov posameznih NV od povprečnega kota pri visoko urejenih vzorcih, ki smo jih izmerili pri najvišjih obratih. Razvidno je, da sta porazdelitvi ozki in z visokimi frekvencami, kar kaže na to, da je večina NV usmerjena v isto smer, to pa je tudi v skladu s SEM slikami istih vzorcev.



Slika 23: Histograma visoko urejenih NV in pripadajoči SEM slike.

Za podrobnejše in bolj jasno razlikovanje med enakimi porazdelitvami kotov smo porazdelitev v histogramih ovrednotili z odstotkom urejenosti NV (slika 24), definiranim kot razmerje med številom NV v najožjem definiranem intervalu (od -10° do 10°) in številom vseh izmerjenih NV. Pri tem večji odstotek nakazuje večjo urejenost, kar pa pomeni, da ima večina NV analiziranega vzorca odklone od glavne smeri urejenosti manjše od 10° .



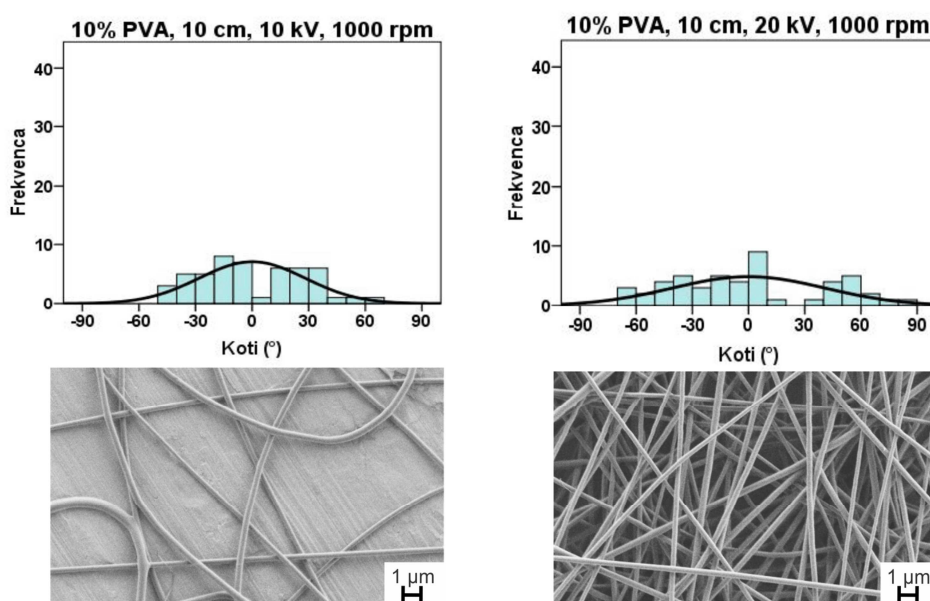
Slika 24: Primer odčitavanja števila NV, ki so na intervalu od -10° do 10° .

V preglednici I so prikazani rezultati odstotkov urejenosti, izračunani pri vzorcih visoke urejenosti. Razberemo lahko, da je največja urejenost NV pri 10% PVA, 15 cm, 25 kV, 6000 rpm, kar pa smo opazili že na SEM sliki vzorca. Urejenost je bila visoka tudi pri 8% PVA, 15 cm, 25 kV, 6000 rpm in 12% PVA, 10 cm, 25 kV, 6000 rpm, vendar smo po primerjavi s SEM slikami ugotovili, da se je pri slednji pojavilo več anomalij v obliki zlitih NV, kar pa za nadaljnjo uporabo ni zaželeno. V preglednici nismo prikazali odstotkov urejenosti vzorcev NV s tankimi nanosi, saj zaradi manjšega števila NV meritve nakazujejo lažno zelo visoko urejenost, poleg tega pa tudi že sama krhkost takšnih vzorcev onemogoča njihovo nadaljnjo uporabo.

Preglednica I: Preglednica odstotkov NV, ki so znotraj intervala od -10° do 10° .

Histogram	Odstotek urejenosti
10% PVA, 15 cm, 25 kV, 6000 rpm	68%
8% PVA, 15 cm, 25 kV, 6000 rpm	66%
12% PVA, 10 cm, 25 kV, 6000 rpm	66%

Za razliko od urejenih NV so neurejena NV, ki so prevladovala pri najnižjih hitrostih vrtenja zbirala, imela široke in nizke porazdelitve frekvenc, kar sovпада z ugotovitvijo, da pri nizkih obratih še ne dosežemo urejenosti NV (slika 25). Neurejenost se je kazala v obliki zavitih NV ali kot preplet NV z nedefinirano oziroma naključno smerjo urejenosti. Pri primerjavi histogramov dveh vzorcev neurejenih NV z vidno različno stopnjo urejenosti opazimo pri porazdelitvi le manjšo razliko med njima, kar pa ne odraža razlik, razvidnih na SEM slikah. Slednje pripisujemo postopku meritve, saj smo pri merjenju zavitih NV upoštevali kot med vertikalno linijo in tangento na zaviti del NV, ki se je stikal z vertikalno linijo, s tem pa zavito NV obravnavamo kot ravno ter tako izgubimo informacijo o ukrivljenosti NV.



Slika 25: Histograma izmerjenih kotov neurejenih NV in pripadajoči SEM sliki.

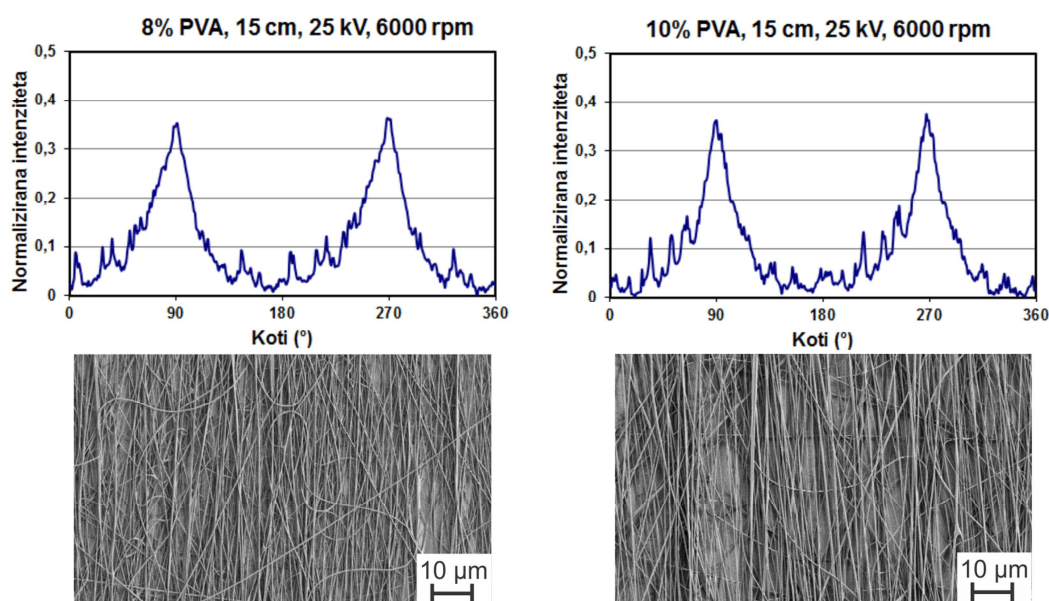
Zaključimo lahko, da z metodo merjenja kotov s pomočjo vertikalne linije sicer lahko objektivno določimo urejenost NV, vendar pa oblika histograma ne pokaže vedno vseh značilnosti vzorca, ki omogočajo ustrezno interpretacijo rezultatov. Nadalje ugotavljamo, da je primerjava podatkov v histogramu s SEM sliko nujna tudi z vidika informacij o debelini nanosa in morebitnih anomalijah NV, ki nam jih same meritve ne dajejo v celoti. Ne nazadnje je izredno pomembna še natančnost merjenja, ki zahteva analizo pod velikimi povečavami, kar lahko vpliva na rezultat, saj s tem analiziramo manjšo površino vzorca.

Vrednotenje urejenosti z metodo hitre Fourierove transformacije

Vzorcem smo določevali urejenost NV tudi z metodo FFT, ki je vezana na algoritme grafičnega programa ImageJ. Za čim bolj objektivno merjenje smo pri izvedbi metode zagotovili enako analizo vseh SEM slik, ki jih predhodno nismo grafično obdelali. S spreminjanjem kontrasta slike ali dodajanjem posebnih vnosnih mask bi sicer dobili bolj gladke krivulje grafov, kar pa bi lahko privedlo do lažnih rezultatov. Metoda je hitra in uporabna pri razlikovanju vzorcev, ki imajo sicer navidezno podobno urejenost, je pa seveda tudi tukaj pri interpretaciji rezultatov neizogibna primerjava skladnosti s SEM slikami.

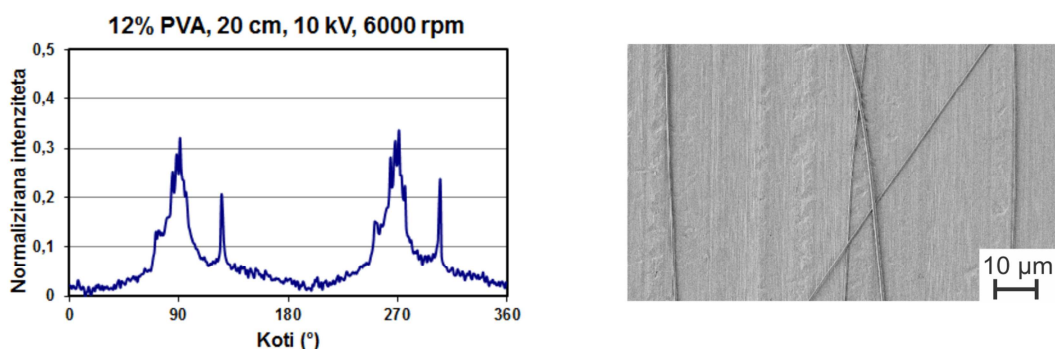
Analizo SEM slik z metodo FFT smo izvedli pri 2000 x povečavi zato, ker smo želeli preveriti urejenost NV na večji površini vzorca in še dodatno zmanjšati vpliv ozadja SEM slike.

Slika 26 prikazuje grafa urejenih NV, dobljenih po FFT analizi SEM slik. Vidimo lahko, da imata oba grafa ozke vrhove z visoko normalizirano intenziteto, kar nakazuje na že precej visoko stopnjo urejenosti NV, kar je tudi v skladu s SEM slikami.



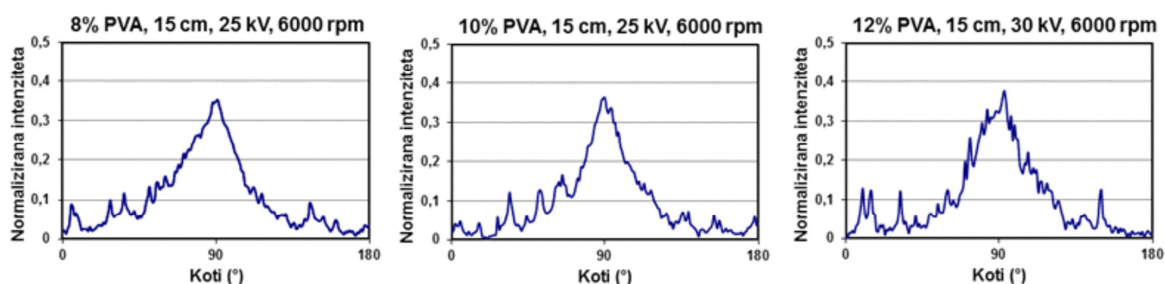
Slika 26: Grafa FFT urejenih NV in pripadajoči SEM slike.

Podobno kot pri metodi merjenja kotov smo tudi pri FFT opazili lažne rezultate urejenosti NV, ki so se odražali kot ozki grafi z visoko intenziteto, kar je v nasprotju s SEM slikami. To pa se je izkazalo predvsem pri slikah neurejenih NV s tanjšimi nanosi (slika 27), kar pripisujemo dejstvu, da kljub nizki povečavi ni bilo vidnih dovolj NV, da bi jih lahko realno ocenili.



Slika 27: Graf FFT lažno urejenih NV in pripadajoča SEM slika.

Za objektivno razlikovanje med enako visokimi vrhovi posameznih vzorcev, ki so kazali na urejenost NV, smo grafom FFT izračunali površino vrhov. Ker so zaradi radialnega seštevanja, ki smo ga uporabili pri metodi FFT, grafi simetrični, smo izračunali površino le enega vrha (slika 28), v preglednici II pa prikazali izračunane površine vrhov, ki pripadajo vzorcem najbolj urejenih NV.



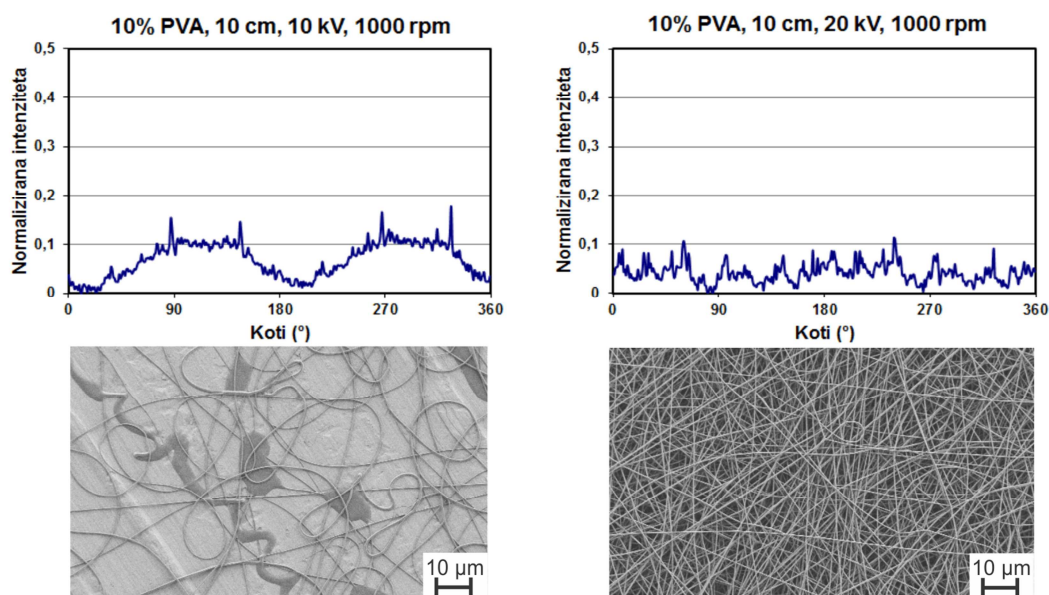
Slika 28: Grafi FFT urejenih NV s približno enakimi vrhovi, ki smo jim preračunali površine vrhov.

Preglednica II: Preglednica izračunanih površin vrhov najbolj urejenih vzorcev.

Graf FFT	Izračunana površina vrha
10% PVA, 15 cm, 25 kV, 6000 rpm	11,3
8% PVA, 15 cm, 25 kV, 6000 rpm	12,4
12% PVA, 15 cm, 30 kV, 6000 rpm	13,1

Ob predpostavki, da imajo pri enaki višini najožji vrhovi najmanjšo površino, smo ugotovili, da so NV pri povečavi 2000 x najbolj urejena pri 10% PVA, 15 cm, 25 kV, 6000 rpm, kar je potrjeno tudi s SEM sliko (slika 26). Visoko urejenost NV smo opazili tudi pri 8% PVA, 15 cm, 25 kV, 6000 rpm. Ugotovitve se tudi skladajo z rezultati, ki smo jih pridobili z metodo merjenja kotov, pri tem pa nekoliko odstopa urejenost NV pri 12% PVA, 15 cm, 30 kV, 6000 rpm, ki je z metodo merjenja kotov nismo uvrstili med najbolj urejene, kar je najverjetneje posledica razlik v povečavi.

Naključno urejena NV, ki smo jih iz SEM slik opazili pri 1000 rpm, so po analizi FFT dajale grafe z zelo širokimi vrhovi in z nizko normalizirano intenziteto, kar prikazuje slika 29. Nadalje smo ugotovili, da so vzorci z gostejšim nanosom NV in nejasno smerjo urejenosti dajali grafe z nižjo intenziteto ter nedefiniranimi vrhovi, medtem ko druge napake na NV, kot so na primer združena NV ali kaplje polimera, na obliko vrhov niso imele večjega vpliva.



Slika 29: Grafa FFT neurejenih NV in pripadajoči SEM sliki.

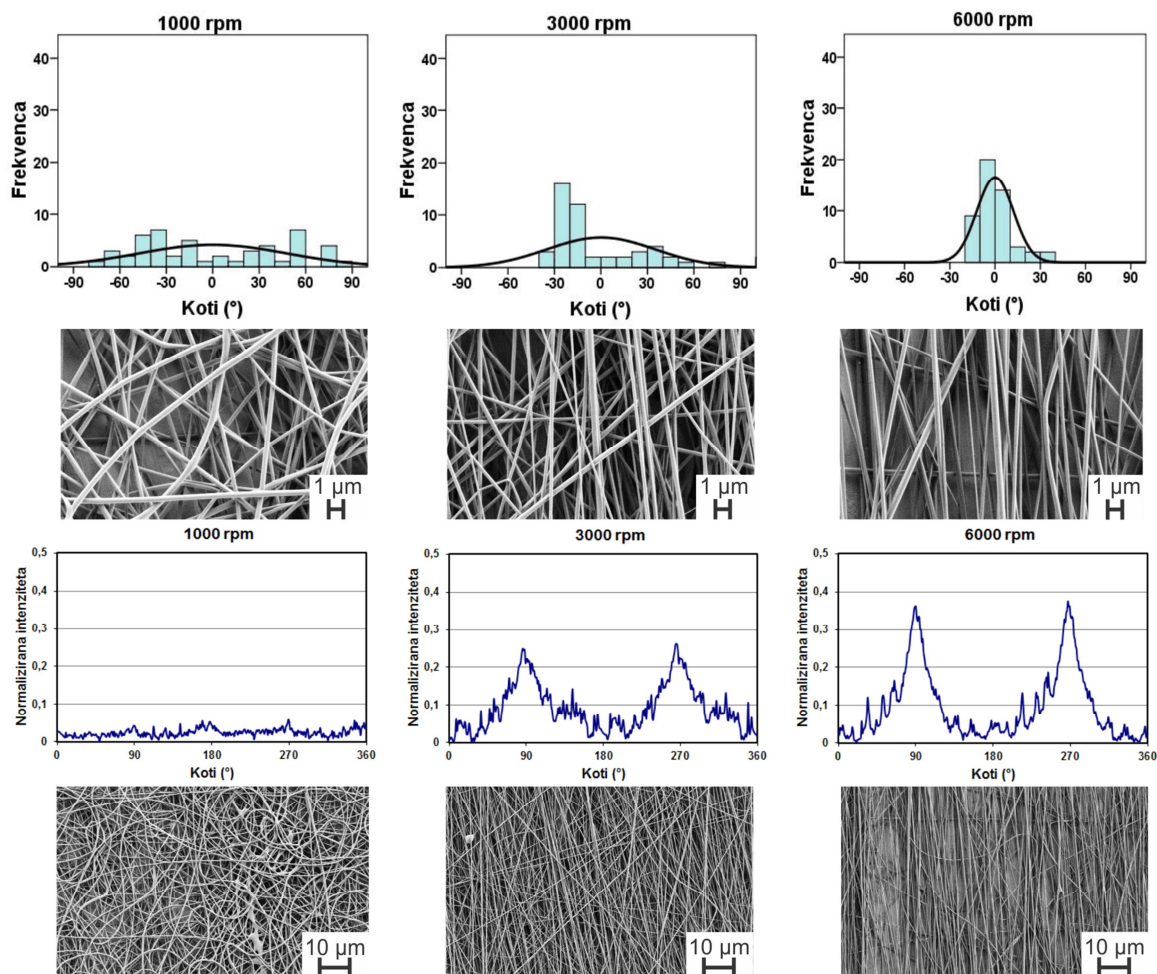
Vpliv pogojev elektrostatskega sukanja na urejenost nanovlaken

Spreminjanje pogojev elektrostatskega sukanja je vplivalo na morfologijo nastalih NV, kar se je tudi odražalo v rezultatih obeh metod za ocenjevanje urejenosti. Pri pregledu vpliva posameznih pogojev smo primerjali spreminjanje oblik histogramov in grafov, dobljenih po analizi SEM slik z metodo merjenja kotov pri 10.000 x in FFT pri 2000 x povečavi.

Vpliv obratov

Slika 30 prikazuje spreminjanje oblike porazdelitve kotov pri različnih obratih, 10% PVA, 15 cm in 25 kV. Jasno lahko vidimo, da se z večanjem obratov porazdelitev zviša in zoža, kar nakazuje na večjo stopnjo urejenosti NV, to pa sovпада tako s SEM slikami kot tudi z našimi predhodnimi ugotovitvami. Pri 1000 rpm smo tako dobili histogram s široko porazdelitvijo in nizkimi frekvencami, kar je značilno za neurejena NV. Z zviševanjem obratov na 3000 rpm se je porazdelitev frekvenc nato nekoliko zožala in zvišala, saj so se NV začela urejati, vendar pa se je urejenost še vedno kazala v več smereh. Pri najvišjih

obratih pa je bila oblika histograma najožja in najvišja, kar je kazalo na največjo urejenost NV, jasno razvidno tudi s SEM slike kot orientiranost NV v eno smer.



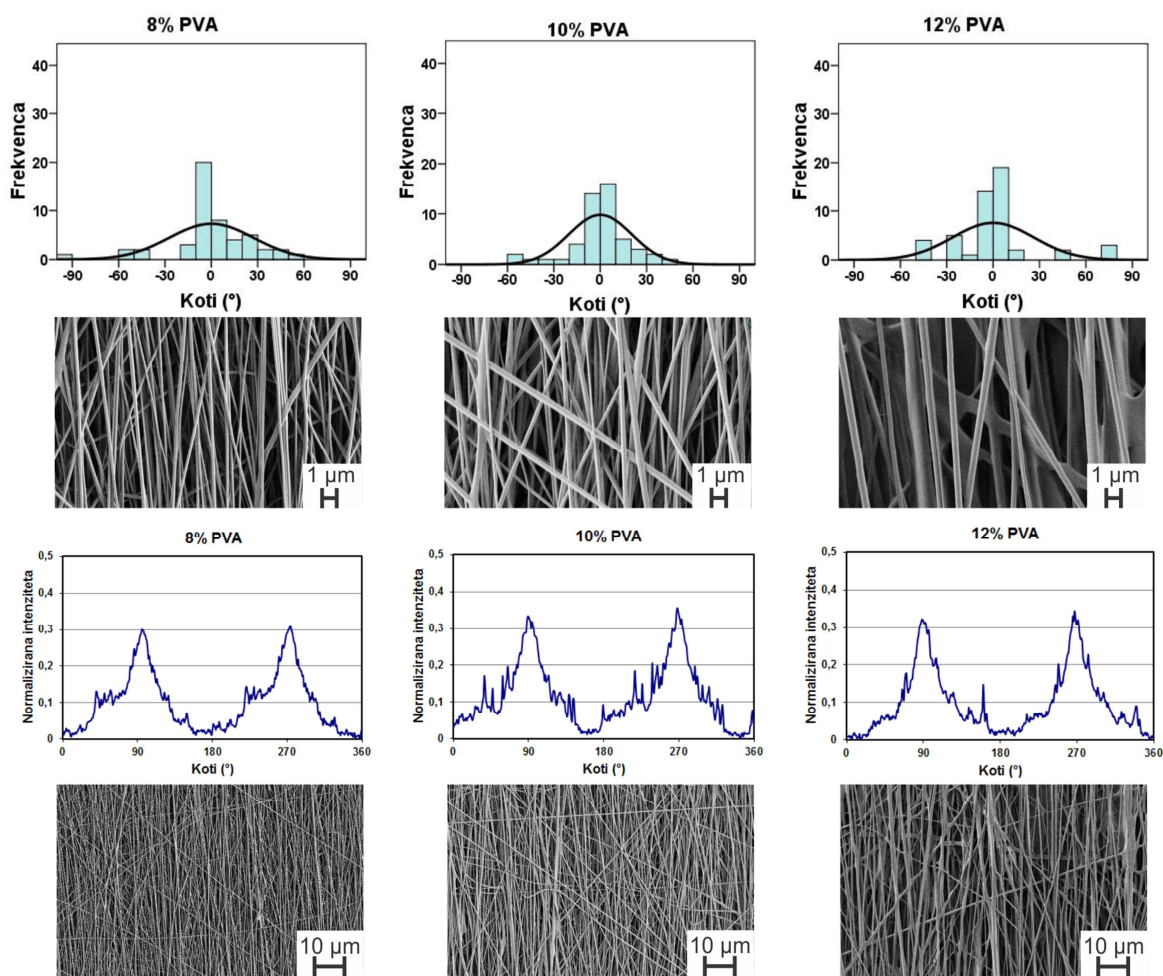
Slika 30: Histogrami kotov in grafi FFT s pripadajočimi SEM slikami NV pri različnih obratih, 10% PVA, 15 cm in 25 kV.

Vpliv hitrosti vrtenja zbirala smo opazili tudi pri FFT analizi, saj so se spremenile oblike dobljenih grafov. Na sliki 30 lahko vidimo, da z večanjem obratov dobimo višje in ožje vrhove, ki so značilni za bolj urejena NV, sklepamo pa še lahko, da je največja stopnja urejenosti NV pri najvišjih obratih, kar sovпада tako s SEM slikami kot rezultati, dobljenimi z metodo merjenja kotov. Pri najnižjih obratih 1000 rpm smo tako po FFT analizi dobili grafe z neizrazitimi vrhovi in nizkimi normaliziranimi intenzitetami, ki so kazali na neurejena NV, kar smo videli tudi na SEM slikah kot NV s precej zavoji in nedefinirano smerjo urejenosti. Z večanjem hitrosti vrtenja zbirala so pri 3000 rpm vrhovi grafov FFT postali bolj definirani in z višjimi normaliziranimi intenzitetami, kar je nakazovalo na prisotno urejanje NV, pri čemer pa so široki vrhovi predstavljali usmerjenost NV še zmeraj v več smereh. Pri najvišji hitrosti vrtenja 6000 rpm so bili

vrhovi FFT grafov najožji in z najvišjo normalizirano intenziteto v primerjavi s prejšnjimi obrati, kar je kazalo na največjo urejenost NV. S SEM slik je tudi razvidno, da so bila NV ob teh pogojih večinoma urejena v eni smeri, na nastanek nekoliko širših vrhov pa so vplivala posamezna NV, ki niso sledila glavni smeri urejenosti.

Vpliv koncentracije

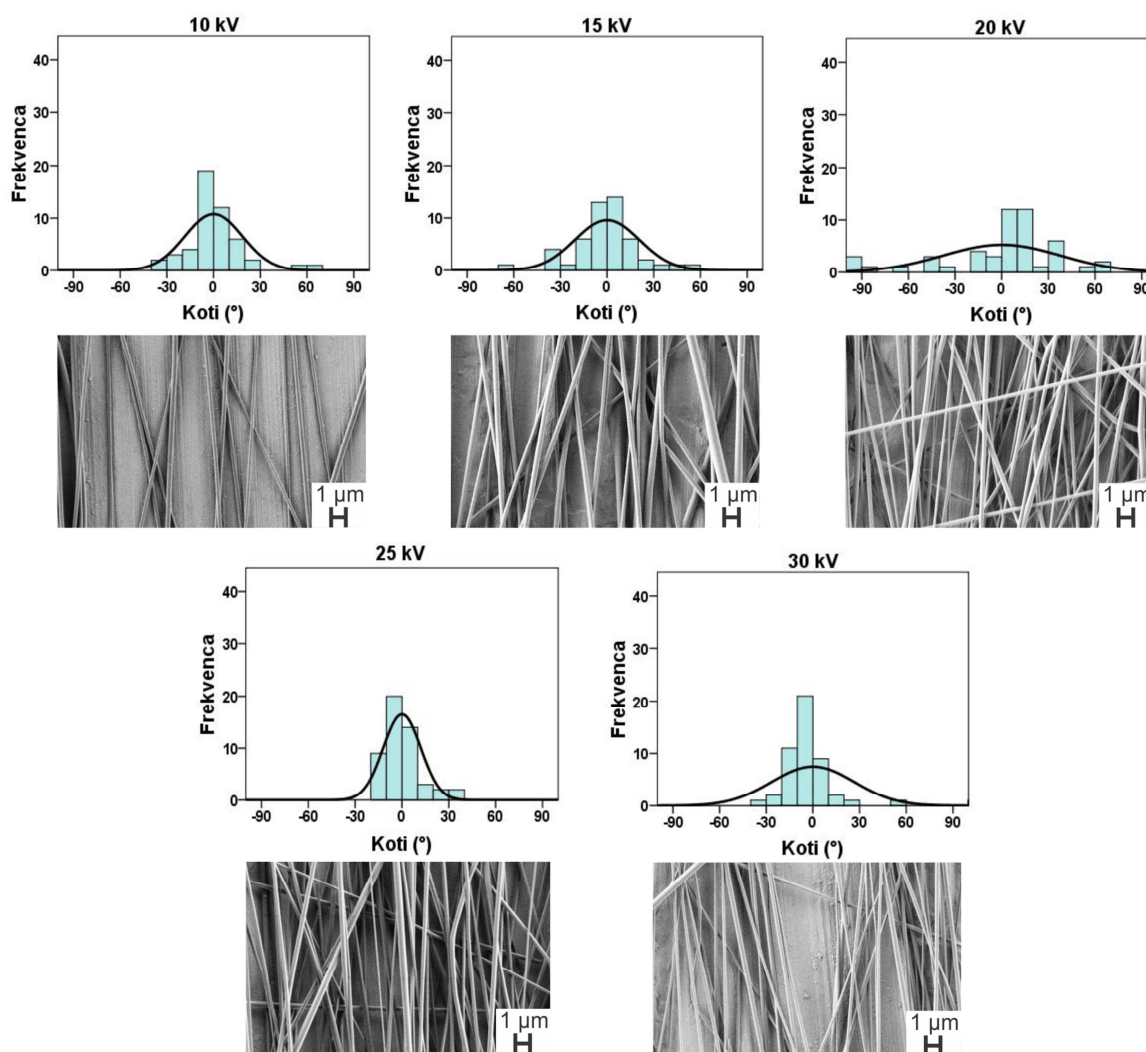
Slika 31 prikazuje spreminjanje oblike histogramov in FFT grafov pri različnih koncentracijah PVA. Vidimo lahko, da se krivulje normalne porazdelitve in oblike grafov med seboj ne razlikujejo, torej spreminjanje koncentracije PVA ne vpliva, kar se sklada s pripadajočimi SEM slikami.



Slika 31: Histogrami kotov in grafi FFT s pripadajočimi SEM slikami NV pri različnih koncentracijah, 10 cm, 25 kV in 6000 rpm.

Vpliv napetosti

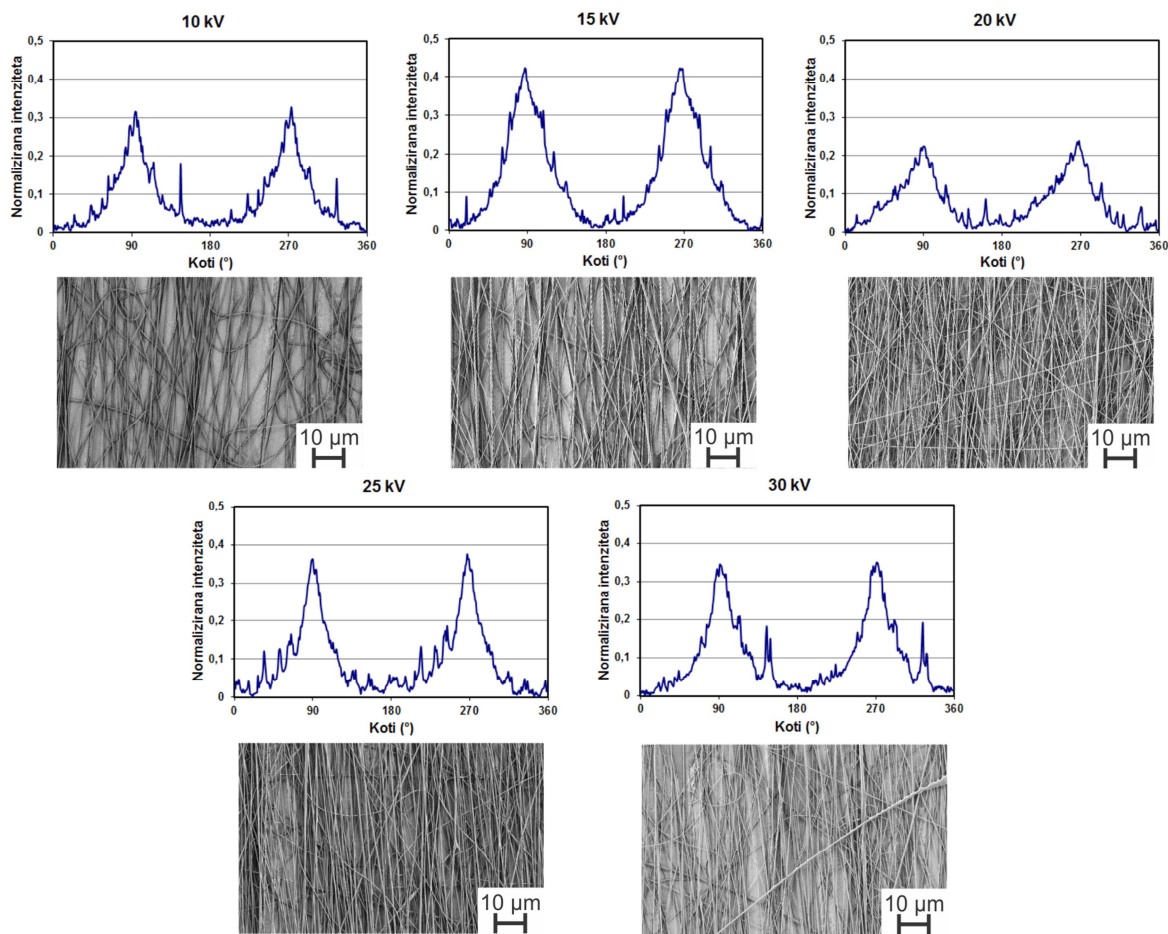
Primerjava histogramov meritev kotov na sliki 32 kaže, da spreminjanje napetosti vpliva na obliko porazdelitve frekvenc kot odraz razlik v urejenosti NV. Pri 10 in 15 kV sta bila histograma podobnih oblik in s podobnimi frekvencami. Vidno odstopanje smo opazili pri 20 kV, kjer je bila frekvenčna porazdelitev najnižja in najširša, kar je kazalo na neurejenost NV, ki smo jo potrdili tudi s SEM sliko. Največja urejenost je bila v obliki najvišje in najožje porazdelitve pri 25 kV, zviševanje napetosti do 30 kV pa je nekoliko poslabšalo urejenost NV.



Slika 32: Histogrami kotov in SEM slike NV pri različnih napetostih, 10% PVA, 15 cm in 6000 rpm.

Tudi rezultati metode FFT so vodili do zaključka, da imajo različne napetosti različne vplive na urejenost NV. Opazili smo, da so se razlike v urejenosti NV bolj jasno odražale na grafih FFT kot na histogramih merjenja kotov. Pri nizkih napetostih smo tako opazili nižje in širše vrhove, ki so kazali na neurejenost NV (slika 33). Izjema sta visoka in široka

vrhova pri 15 kV, ki kažeta na urejenost NV, vendar pa je iz slike SEM vidno, da gre za usmerjenost v več smereh in tanjši nanos NV, ki zviša normalizirano intenziteto. Najnižja in najširša vrhova pri 20 kV potrjujeta neurejenost v več smereh, kar smo že ugotovili pri metodi merjenja kotov. Pri 25 kV opazimo najožja in visoka vrhova, ki kažeta največjo urejenost NV, nadaljnje višanje napetosti do 30 kV pa povzroči nastanek širših vrhov, kar ponovno potrdi manjšo urejenost odlaganja NV na zbiralu, kar je najverjetneje posledica večje nabitosti in nestabilnosti curka.

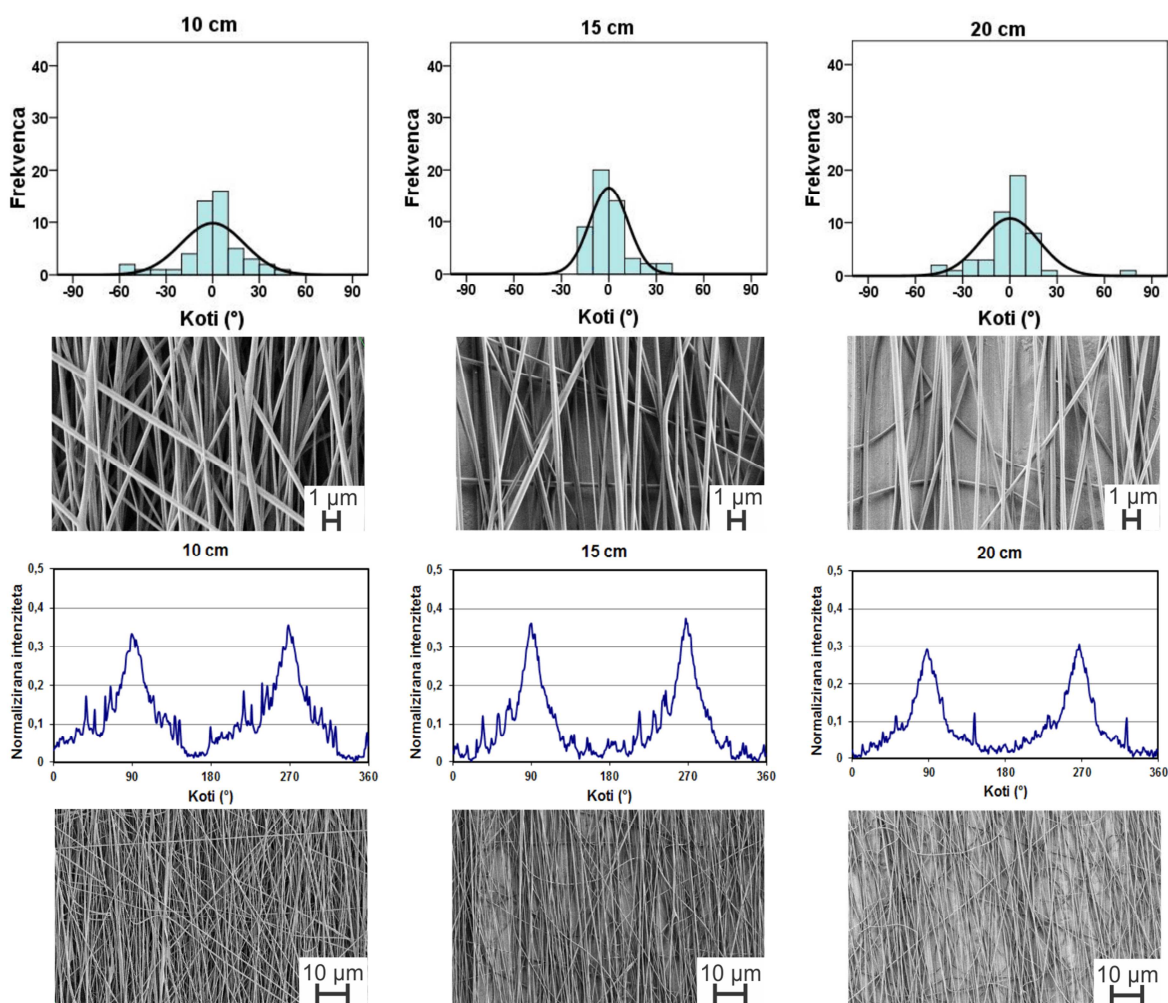


Slika 33: Grafi FFT in SEM slike NV pri različnih napetostih, 10% PVA, 15 cm in 6000 rpm.

Vpliv razdalje

Na sliki 34 lahko vidimo razlike v obliki frekvenčnih porazdelitev in FFT grafov glede na razdaljo med kovinsko iglo in zbiralom. Opazimo lahko, da so oblike histogramov višje in ožje z večanjem razdalje do 15 cm, kar tudi skupaj s SEM slikami nakazuje na povečevanje urejenosti NV, nadaljnje večanje razdalje do 20 cm pa nekoliko zniža in razširi frekvenco porazdelitve, kar kaže na zmanjšanje urejenosti NV.

Vpliv razdalje na izdelana NV smo potrdili tudi z metodo FFT (slika 34). Pri 10 cm smo opazili visoka in nekoliko široka vrhova, ki nakazujeta na usmerjenost v eni smeri s posameznimi NV, ki ne sledijo glavni usmerjenosti. Z večanjem razdalje na 15 cm sta bila vrhova ožja in višja, kar kaže na višjo stopnjo urejenosti NV. Nadaljnje večanje razdalje na 20 cm povzroči zmanjšano urejenost NV, kar se vidi tako v nastanku nižjih in širših vrhov, kakor tudi na SEM slikah.



Slika 34: Histogrami kotov in grafi FFT s pripadajočimi SEM slikami NV pri različnih razdaljah, 10% PVA, 25 kV in 6000 rpm.

Primerjava uporabljenih metod za vrednotenje urejenosti nanovlaken

Že pri pregledu literature smo ugotovili, da obstajajo številne metode za vrednotenje urejenosti NV. V našem delu smo se osredotočili na različni grafični metodi, ki temeljita na vrednotenju SEM slik, in sicer metodo merjenja kotov glede na vertikalno linijo ter metodo FFT. Slednji sta namreč po našem mnenju izkazovali največjo stopnjo objektivnega določevanja urejenosti, njuna izvedba je bila relativno enostavna ter ob uporabi nam dostopne programske podpore. Glavne prednosti in slabosti posamezne metode smo predstavili v preglednici III.

Preglednica III: Primerjava metod za vrednotenje urejenosti NV.

Metoda merjenja kotov	Metoda FFT
PREDNOSTI: - enostavna izvedba merjenja - ne potrebuje posebnega grafičnega programa - obdelava in interpretacija dobljenih rezultatov ni zahtevna SLABOSTI: - za natančnejše merjenje je potrebna večja povečava - težave pri merjenju vzorcev NV z vertikalno urejenostjo, zato so potrebne modifikacije metode - ne zajame anomalij vzorca NV - ne razlikuje med zaviti in ravnimi NV - zamudna pri meritvah več vzorcev - interpretacija rezultatov zahteva primerjavo s SEM slikami	PREDNOSTI: - omogoča analizo vzorcev pri različnih povečavah - hitra metoda - občutljiva tudi na anomalije vzorca, predvsem pri večjih povečavah SLABOSTI: - zahtevnejša izvedba z več koraki merjenja - potreben je grafični program, ki omogoča FFT analizo in radialno seštevanje - zahteva normalizacijo, da se zmanjša vpliv različnih osvetlitev vzorca - grafična obdelava slik vpliva na rezultate - interpretacija rezultatov zahteva primerjavo s SEM slikami

4.4 MOŽNOSTI OPTIMIZACIJE UREJENIH NANOVLAKEN

Z metodo elektrostatskega sukanja in zbiranjem NV na vrtečem zbiralu v obliki bobna smo uspešno izdelali urejena NV, vendar pa bi jih bilo potrebno za uporabo v tkivnem inženirstvu in oblogah za rane še nekoliko modificirati. Kljub številnim raziskavam tega področja še vedno ni natančno opredeljeno, kakšna točno naj bo struktura urejenih NV za posamezen namen uporabe, nam pa *in vitro* študije omogočajo vsaj okvirno sklepanje na ključne lastnosti posameznih NV.

V tkivnem inženirstvu je tako visoka urejenost NV izrednega pomena. Mreža NV usmerja razrast celic, ne glede na njihovo vrsto; pri tem vsako NV, ki ne sledi glavni usmerjenosti, prepreči njihovo raztegovanje in migracijo. Minimalno zahtevana stopnja urejenosti NV sicer ni definirana, vendar pa pri izdelavi težimo k popolnoma vzporednim NV. Ker je mreža naših najbolj urejenih NV še vedno vsebovala nekaj prečno položenih NV, kot najboljšo rešitev za njihovo nadaljnjo uporabo predlagamo uporabo vrtečega diska namesto bobna kot zbirala. S tem bi najverjetneje dosegli popolno urejenost NV, res pa je tudi, da bi nanos NV bil bistveno ožji. Potencial tako izdelanih NV po drugi strani vidimo v tem, da bi ta lahko predstavljala nov pristop v terapiji nevrodegenerativnih bolezni, saj strukturno bolje posnemajo živce, za še boljšo razrast živčnih celic pa bi lahko uporabili tudi druge polimere (na primer kombinacijo polikaprolaktona in hitosana). Na tem mestu velja poudariti, da so naša izdelana NV glede na svojo debelino in širino nanosa že primerna za uporabo pri celjenju ran. Njihova mreža je namreč dovolj široka za pokritje rane, hkrati pa tudi dovolj trdna za rokovanje. Visoka urejenost NV bi po eni strani omogočala usmerjeno razrast celic ter spodbudila lasten regenerativni proces, po drugi strani pa bi hidrofilnost uporabljenega polimera zagotavljala še vlažno mikrookolje na rani, kar bi dodatno pospešilo celjenje.

Nadalje bi lahko urejenost NV nekoliko izboljšali s krajšim časom elektrostatskega sukanja, saj bi s tem zmanjšali odložitev neurejenih NV v zgornjih plasteh vzorca. Poleg tega bi lahko uporabili tudi manjši boben z večjim premerom, s katerim bi dosegli višje hitrosti vrtenja, stabilnost curka pa bi lahko povečali še z uporabo dodatnih elektrod, ki bi omogočile nadzor električnega polja.

Ne nazadnje bi lahko NV še nadgradili z dodatkom zdravilnih učinkovin in/ali plastjo netopnih NV, ki bi preprečevala prehitro razgradnjo hidrofilne obloge za rano, zagotavljala zaščito pred zunanjimi vplivi in regulirala profil sproščanja. V kolikor bi izdelanim NV dodali hidroksiapatit, bi jih lahko uporabili tudi kot kostne nadomestke. Z njihovo sestavo

bi namreč posnemali kostno ogrodje; urejenost, ki v tem primeru niti ni potrebno, da je popolna, pa bi povečala mehansko trdnost nadomestka.

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo izdelali urejena PVA NV z metodo elektrostatskega sukanja ob uporabi vrtečega zbirala v obliki bobna ter s sistematičnim spreminjanjem pogojev preučili njihov vpliv na premer in urejenost NV.

Dokazali smo, da zbiranje NV na vrtečem zbiralu z večanjem hitrosti vrtenja omogoči nastanek bolj ravnih in urejenih NV. Ugotovili smo, da s spreminjanjem napetosti in razdalje vplivamo na stabilnost curka med procesom izdelave ter s tem posledično na morfologijo izdelanih NV. Nadalje smo opazili, da je višanje koncentracije raztopine PVA na 12% vodilo do težav v procesu izdelave, kar se je odražalo v tanjšem nanosu NV z več anomalijami.

Tekom eksperimentalnega dela smo izdelali NV s premeri od 150 pa vse do 700 nm. Premer se je večal z večanjem koncentracije PVA, ni bil odvisen od hitrosti vrtenja zbirala, zmanjšal se je z višanjem napetosti, razlike so se pojavile tudi pri različnih razdaljah.

Urejenost NV smo določali z dvema objektivnima metodama pri različnih povečavah SEM slik. Z metodo merjenja kotov in FFT analizo smo jasno dokazali, da so najbolj urejena NV nastala pri 10% PVA, 15 cm, 25 kV in 6000 rpm. Potrdili smo, da se je urejenost NV povečala z večanjem obratov. Koncentracija na urejenost ni imela signifikantnega vpliva, spreminjanje napetosti in razdalje pa je zaradi razlik v nastalem električnem polju različno vplivalo na urejenost NV. Dodatno smo pokazali, da je pri vrednotenju urejenosti pomemben podatek o debelini nanosa NV, saj vzorci s tanjšim nanosom hitreje kažejo lažno visoko urejenost.

Uporabljeni metodi vrednotenja urejenosti NV sta objektivni in primerni za analizo naših vzorcev, vendar pa zahteva interpretacija njunih rezultatov primerjavo s SEM slikami. Kot učinkovitejša in hitrejša metoda prve izbire se je izkazala metoda FFT, kjer urejenost NV ocenjujemo glede na višino in obliko dobljenih grafov, pri tem pa velja, da najvišji in najožji vrhovi predstavljajo največjo urejenost.

Rezultati diplomskega dela tako nedvomno predstavljajo temeljno osnovo za nadaljnji razvoj urejenih NV, ki izkazujejo velik potencial pri izdelavi različnih visoko strukturiranih tkivnih nadomestkov in naprednih oblog za celjenje ran.

6 LITERATURA

1. Frenot A, Chronakis IS: Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2003; 8: 64-75.
2. Kumbar SG, Nukavarapu SP, James R, Hogan MV, Laurencin CT: Recent patents on electrospun biomedical nanostructures: An overview. *Recent Patents on Biomed Eng* 2008; 1: 68-78.
3. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S: A review on polymer nanofibers by electrospinning and their application in nanocomposites. *Compos Sci Technol* 2003; 63: 2223-2253.
4. Baker SC, Atkin N, Gunning PA, Granville N, Wilson K, Wilson D, Southgate J: Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. *Biomaterials* 2006; 27: 3136-3146.
5. Humar M, Šmid-Korbar J, Obreza A: Farmacevtski terminološki slovar. Založba ZRC. Ljubljana, 2011.
6. Pham QP, Sarma U, Mikos AG: Electrospinning of polymer nanofibers for tissue engineering applications: A review. *Tissue engineering* 2006; 12 (5): 1197-1211.
7. Sill TJ, von Recum HA: Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 1989-2006.
8. Wang HB, Mullins ME, Cregg JM, Hurtado A, Oudega M, Trombley M, Gilbert RJ: Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications. *J Neural Eng* 2009; 6: 016001.
9. Biran R, Noble MD, Tresco PA: Directed nerve outgrowth is enhanced by engineered glial substrates. *Exp Neurol Suppl* 2003; 184: 141-152.
10. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM: Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J Pharm Sci* 2008; 97 (8): 2892-2922.
11. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G: Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* 1999; 7 (6): 442-452.
12. Pelipenko J, Kocbek P, Govedarica B, Rošic R, Baumgartner S, Kristl J: The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 84: 401-411.
13. Teo WE, Ramakrishna S: A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* 2006; 17: 89-106.

14. Rošic R, Pelipenko J, Kristl J, Kocbek P, Baumgartner S: Properties, engineering and applications of polymeric nanofibers: Current research and future advances. *Chem Biochem Eng Q* 2012; 26 (4): 417-425.
15. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Lim TC, Ma Z: An introduction to electrospinning and nanofibers, World Scientific, Singapore, 2005.
16. Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B: Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* 2002; 43: 4403-4412.
17. Ojha SS, Afshari M, Kotek R, Gorga RE: Morphology of electrospun Nylon-6 nanofibers as a function of molecular weight and processing parameters. *J Appl Polym Sci* 2007; 108: 308-319.
18. Geng X, Kwon O-H, Jang J: Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 2005; 26: 5427-5432.
19. Tripatanasuwan S, Zhong Z, Reneker DH: Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethylene oxide) aqueous solution. *Polymer* 2007; 28: 5742-5746.
20. Cooper A, Bhattarai N, Zhang M: Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan-PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydr Polym* 2011; 85: 149-156.
21. Li D, Wang Y, Xia Y: Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nano Lett* 2003; 3: 1167-1171.
22. Baji A, Mai Y-W, Wong S-C, Abtahi M, Chen P: Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Compos Sci Technol* 2010; 70: 703-718.
23. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL: Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 2002; 3: 232-238.
24. Lee J, Deng Y: Increased mechanical properties of aligned and isotropic electrospun PVA nanofiber webs by cellulose nanowhisker reinforcement. *Macromol Res* 2012; 20: 76-83.
25. Katta P, Alessandro M, Ramsier RD, Chase GG: Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector. *Nano Lett* 2004; 4: 2215-2218.

26. Theron A, Zussman E, Yarin AL: Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibers. *Nanotechnology* 2001; 12: 384-390.
27. Xu CY, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S: Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 877-886.
28. Liao C-C, Wang C-C, Chen C-C: Stretching-induced crystallinity and orientation of polylactic acid nanofibers with improved mechanical properties using an electrically charged rotating viscoelastic jet. *Polymer* 2011; 52: 4303-4318.
29. Dabirian F, Hosseini Ravandi SA, Pishavar AR, Abuzade RA: A comparative study of jet formation and nanofiber alignment in electrospinning and electrocentrifugal spinning systems. *J Electrostat* 2011; 69: 540-546.
30. Khamforoush M, Mahjob M: Modification of the rotating jet method to generate highly aligned electrospun nanofibers. *Mater Lett* 2011; 65: 453-455.
31. Goldstein JI, Newbury DE, Joy DC, Lyman CE, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael JR: Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis, Plenum Press, New York, 2003.
32. Gómez-Tejedor JA, Van Overberghe N, Rico P, Gómez Ribelles JL: Assessment of the parameters influencing the fiber characteristics of electrospun poly(ethyl methacrylate) membranes. *Eur Polym J* 2011; 47: 119-129.
33. Ayres CE, Shekar Jha B, Meredith H, Bowman JR, Bowlin G, Henderson SC, Simpson DG: Measuring fiber alignment in electrospun scaffolds: a user's guide to the 2D fast Fourier transform approach. *J Biomater Sci Polymer Edn* 2008; 19 (5): 603-621.
34. Bolton S: Pharmaceutical statistics: practical and clinical applications, 3rd ed, M. Dekker, New York, 1997.
35. Green SB, Salkind NJ: Using SPSS for Windows and Macintosh: Analyzing and understanding data, 5th ed., Pearson Prentice Hall, New Jersey, 2008.
36. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC: Pharmaceutical excipients. Pharmaceutical Press 2004.
37. DeMerlis CC, Schoneker: Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem Toxicol* 2003; 41: 319-326.

38. Baker MI, Walsh SP, Schwartz Z, Boyan BD: A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100: 1451-1457.
39. Kenawy E-R, Abdel-Hay FI, El-Newehy MH, Wnek GE: Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers. *Mater. Sci. Eng. A* 2007; 459 (1): 390-396.
40. Asran AS, Henning S, Michler GH: Polyvinyl alcohol-collagen-hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer* 2010; 51: 868-876.
41. 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 Nanomedicine* 2011; 6: 993–1003.
42. Abdelgawad AM, Hudson SM, Rojas OJ: Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydr Polym* 2013; doi: 10.1016/j.carbpol.2012.2.043.
43. Li X, Kanjwal MA, Chronakis IS: Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. *Colloids and Surfaces B* 2013; 103: 182-188.
44. Koski A, Yim K, Shivkumar S: Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Mater Lett* 2004; 58: 493-497.