

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HELENA ZAVALOKA

**PREUČEVANJE NANOVLAKEN IZ
POLIVINILALKOHOLA KOT DOSTAVNIH SISTEMOV ZA
NESTEROIDNE ANTIREVMATIKE**

**INVESTIGATION OF POLIVYNIL ALCOHOL
NANOFIBERS AS DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR
NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS**

Ljubljana, 2013

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

ZAHVALA

Iskrena hvala prof. dr. Julijani Kristl, mag. farm. in somentorici dr. Romani Rošic, mag. farm. za strokovno pomoč, svetovanje, dosegljivost in potrpežljivost.

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

Ne nazadnje pa se zahvaljujem tudi svojim naj bližnjim za potrpežljivost in spodbudo na vsakem koraku.

IZJAVA

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

Helena Zavaloka

Diplomska komisija:

Predsednik: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

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

Somentorica: dr. Romana Rošic, mag. farm.

Član: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK.....	III
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
1. UVOD	1
1.1. NANOZNANOST IN NANOTEHNOLOGIJA	1
1.2. NANOMEDICINA	1
1.3. NANOVLAKNA	2
1.4. METODA ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA.....	3
1.4.1. Dejavniki raztopine.....	4
1.4.2. Dejavniki procesa	6
1.4.3. Dejavniki okolja	8
1.5. UPORABNOST NANOVLAKEN NA PODROČJU BIOMEDICINE	8
1.6. POLIVINILALKOHOL	11
1.7. NESTEROIDNI ANTIREVMATIKI (NSAID)	12
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. MATERIALI	18
3.1.1. Polimer, topilo in zdravilne učinkovine:	18
3.1.2. Reagenti za pripravo fosfatnega pufra s pH 7,4	18
3.2. APARATURE ZA IZDELAVO NANOVLAKEN	18
3.3. POSTOPEK IZDELAVE NANOVLAKEN	19
3.3.1. Priprava raztopine PVA.....	19
3.3.2. Priprava raztopin učinkovin, polimera in koncentrata	20
3.3.3. Izdelava in stabilizacija nanovlaken	21
3.3.4. Priprava fosfatnega pufra s pH=7,4.....	22
3.3.5. Izdelava umeritvenih premic za posamezne zdravilne učinkovine	22
3.4. VREDNOTENJE NANOVLAKEN	24
3.4.1. Proučevanje morfologije nanovlaken	24
3.4.2. Analiza sproščanja učinkovin iz nanovlaken.....	24
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1. VREDNOTENJE NANOVLAKEN	26

4.1.1.	Vpliv odstotka vgrajene učinkovine na povprečni premer nanovlaken	26
4.1.2.	Vpliv vgrajenih učinkovin na morfologijo nanovlaken.....	29
4.2.	SPROŠČANJE NATRIJEVEGA IBUPROFENATA	35
4.3.	SPROŠČANJE NATRIJEVEGA NAPROKSENATA	35
4.4.	SPROŠČANJE NATRIJEVEGA SALICILATA	36
4.5.	PRIMERJAVA SPROŠČANJA VSEH UČINKOVIN	38
4.5.1.	Sproščanje 1% vsebnosti učinkovin	38
4.5.2.	Sproščanje 5 % vsebnosti učinkovin	39
4.5.3.	Sproščanje 10 % vsebnosti učinkovin	40
4.5.4.	Sproščanje 20 % vsebnosti učinkovin	41
5.	SKLEP.....	43
6.	LITERATURA.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema osnovnih gradnikov naprave za elektrostatsko sukanje	3
Slika 2: Prikaz nastanka Taylor-jevega stožca	4
Slika 3: Prikaz spremembe polimernega curka z višanjem napetosti.....	6
Slika 4: Neurejena (A) in urejena (B) nanovlakna	7
Slika 5: Možni načini vgradnje zdravilnih učinkovin v nanovlakna	10
Slika 6: Struktura molekule PVA	12
Slika 7: Shema nastanka vnetnih mediatorjev in mesto delovanja NSAID	13
Slika 8: Struktura molekule natrijevega ibuprofenata	13
Slika 9: Struktura molekule natrijevega salicilata	14
Slika 10: Struktura molekule natrijevega naproksenata	15
Slika 11: Izgled raztopine PVA z učinkovino	21
Slika 12: Umeritvene premice preiskovanih učinkovin: A - natrijev ibuprofenat, B - natrijev naproksenat, C - natrijev salicilat	23
Slika 13: Fotografija vzorcev nanovlaken za analizo SEM.....	24
Slika 14: Odvzemanje vzorcev z različnimi vsebnostmi posamezne učinkovine v točno določenih časovnih intervalih in njihov prenos na mikrotitrne plošče	25
Slika 15: Vpliv količine dodanega natrijevega ibuprofenata na povprečne premere nanovlaken (n=50). Prikazane so tudi vrednosti SD.	28
Slika 16: Vpliv količine dodanega natrijevega naproksenata na povprečne premere nanovlaken (n=50). Prikazane so tudi vrednosti SD.	28
Slika 17: Vpliv količine dodanega natrijevega salicilata na povprečne premere nanovlaken (n=50). Prikazane so tudi vrednosti SD.....	29
Slika 18: Vpliv različnih količin dodanih natrijevih soli učinkovin na viskoznost 8 % raztopine PVA (38).....	30
Slika 19: Vpliv različnih količin dodanih natrijevih soli učinkovin na površinsko napetost 8 % raztopine PVA (38).	31
Slika 20: Posnetki SEM nanovlaken z različnimi vsebnostmi natrijevega ibuprofenata pri povečavi 20. 000x. Z rdečimi krogi so obkroženi vozli, z rumenimi pa kristali učinkovine na površini nanovlaken.	32
Slika 21: Posnetki SEM nanovlaken z različnimi vsebnostmi natrijevega naproksenata pri povečavi 20. 000x. Z rdečimi krogi so obkroženi vozli, z rumenimi pa kristali učinkovine na površini nanovlaken.	33
Slika 22: Posnetki SEM nanovlaken z različnimi vsebnostmi natrijevega salicilata pri povečavi 20. 000x. Z rdečimi krogi so obkroženi vozli, z rumenimi pa kristali učinkovine na površini nanovlaken.	34
Slika 23: Sproščanje natrijevega naproksenata iz stabiliziranih nanovlaken, izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD za vsako meritev.	36
Slika 24: Sproščanje natrijevega salicilata iz stabiliziranih nanovlaken izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD za vsako meritev.....	37
Slika 25: Sproščanje 1% natrijevega salicilata iz stabiliziranih nanovlaken, izdelanih iz PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD vsako meritev.	39
Slika 26: Sproščanje 5 % natrijevega salicilata in naproksenata iz stabiliziranih nanovlaken, izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD za posamezno meritev.	40

Slika 27: Sproščanje 10 % natrijevega salicilata in naproksenata iz stabiliziranih nanovlaken, izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD za posamezne meritve.	41
Slika 28: Sproščanje 20 % natrijevega salicilata in naproksenata iz stabiliziranih nanovlaken, izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednost SD za posamezne meritve.	42

POVZETEK

Številne raziskave potrjujejo primernost nanovlaken kot sodobnih dostavnih sistemov za vnos različnih zdravilnih učinkovin na površino kože. V diplomski nalogi smo z metodo elektrostatskega sukanja izdelali nanovlakna iz polivinilalkohola (PVA) in vanje vgradili tri nesteroidne antirevmatike, natrijeve soli ibuprofena, naproksena in salicilne kisline. Izdelana nanovlakna smo stabilizirali v suhem sterilizatorju, jih morfološko ovrednotili z vrstičnim elektronskim mikroskopom ter raziskali vpliv posamezne zdravilne učinkovine na njihovo morfolologijo in velikost premerov. Ugotovili smo, da z višanjem odstotka vgrajene hidrofilne učinkovine povprečni premer nanovlaken pada, pri čemer so najtanjša vlakna nastala ob vgradnji natrijeve soli ibuprofena. Na osnovi SEM posnetkov vrstične elektronske mikroskopije smo ugotovili, da so bila vlakna do 5 % vsebnosti učinkovine gladka, pri višjih koncentracijah pa so se pojavljali vozli.

Ugotovili smo tudi, da je pri višji vsebnosti učinkovine učinkovitost vgrajevanja v nanovlakna manjša, saj se v tem primeru pojavijo njeni kristalčki na površini vlaken, kar je bilo najbolj izrazito pri natrijevi soli naproksena, sledili pa sta soli ibuprofena ter salicilne kisline.

Za opredelitev sproščanja preiskovanih učinkovin iz nanovlaken PVA smo razvili model *in vitro* za izredno majhne količine vzorcev. Sproščanje hidrofilne učinkovine iz nanovlaken PVA je izredno hitro, pri 10 in 20 % vsebnosti pa se upočasni. Na osnovi dobljenih profilov sproščanja smo ugotovili, da se ves natrijev ibuprofenat sprosti iz vlaken takoj po dodatku pufra, in sicer ne glede na njegovo vsebnost v nanovlaknih. Sklepamo, da je bila učinkovitost njegove vgradnje v vlakna nizka oziroma nepopolna. Ugotovili smo tudi da se natrijev naproksenat in natrijev salicilat pri nižjih vsebnostih učinkovine (do 5 %) takoj po dodatku pufra v celoti sprostita iz vlaken, pri višjih odstotkih (do 20 %) pa sta se obe učinkovini sproščali počasneje in konstantno skozi celotno testno obdobje. Natrijevega naproksenata se je sprostilo več kot natrijevega salicilata.

Zaključimo lahko, da bi bila za obloge z nanovlakni najbolj primerna 10 in 20 % natrijev naproksenat in natrijev salicilat. Slednji tudi pri 5 % vsebnosti učinkovine. V vsakem primeru pa bi bilo za primerjavo priporočljivo narediti še nanovlakna s salicilno kislino, ibuprofenom in naproksenom.

ABSTRACT

Many researches confirm adequacy of nanofibers as delivery systems of different drugs to the surface of the skin. In our work PVA nanofibers with incorporated three different NSAIDs, sodium salts of ibuprofen, naproxen and salicylic acid, were prepared.

Nanofibers were stabilized with dry heat.

Morphologies and diameters of nanofibers without or with loaded drugs were determined by SEM microscopy. We discovered that higher percentages of incorporated drug result in lower average nanofiber diameters. Using SEM images we have determined, that fibers with low percentage of incorporated drug (under 5 %) had smooth surfaces, while in those with higher percentage (10 and 20 %) knots were noticed. Also by increasing the percentages of incorporated drugs, lower loading efficiencies and consequently the appearance of crystals on the fiber surface were noticed.

For evaluation of PVA nanofibers as a drug delivery system an *in vitro* method for very small amounts of sample was developed. Release of hydrophylic drugs from hydrophylic nanofibers is very fast. Additionally, at 10 and 20 % of drug concentration the release is slower. Based on tested drugs releasing profiles we discovered, that all ibuprofen sodium salt was released from nanofibers immediately, in few minutes, following the start of analysis. We also saw that the two other salts when being incorporated in lower percentages (up to 5 %), were completely released almost immediately. In case of higher nanofiber incorporation percentages (10 and 20 %), naproxen sodium salt and sodium salicylate were released slowly and constantly during the whole time of release experiment.

We can conclude, that naproxen sodium salt and sodium salicylate would be the most appropriate for preparation of nanofiber-based wound dressings, the first one in 10 or 20 % concentration and the second one in 5 %. In any case the formulation of nanofibers with salicylic acid, ibuprofen and naproxen and their evaluation would be needed for comparison.

1. UVOD

1.1. NANOZNANOST IN NANOTEHNOLOGIJA

Nanoznanost je veda, ki obravnava in raziskuje naravo ter uporabo različnih sistemov na nanometerskem nivoju (10^{-9} m) – torej na nivoju atomov in molekul. Beseda *nano* v grškem jeziku »Nanos« pomeni pritlikavec oziroma palček. Eno izmed pomembnejših področij nanoznanosti je nanotehnologija. Ta se ukvarja z razumevanjem novih pojavov in značilnosti (fizikalne, biološke in kemijske) ter z izdelovanjem naprav in materialov v velikostnem razredu med 1 in 1000 nm. Pojavlja se na področjih kemijske, tekstilne, računalniške in informacijske industrije, še zlasti pa ima ogromen potencial na področju farmacevtske dejavnosti in sodobne medicine (1).

Idejo o nanoznanosti je leta 1959 prvič omenil fizik in Nobelov nagrajenec Richard Feynman. V svojem članku »There's Plenty of Room at the Bottom« je namreč omenil možnost premeščanja atomov in izdelavo posebnih naprav za njihovo vizualizacijo ter predstavil idejo o izdelavi majhnih nanorobotov za uporabo v medicini (2, 3, 4, 5). Izraz nanotehnologija je šele 15 let kasneje, leta 1974, vpeljal Norio Taniguchi, takratni profesor na Univerzi za znanost v Tokiu (5, 6). Korenit razvoj nanotehnologije pa se je pravzaprav začel šele po letu 1981, ko so v Švici zgradili prvi vrstični tunelski mikroskop (STM), s katerim so lahko opazovali posamezne atome na površju vzorca. Vse od takrat pa do danes je nanotehnologija izjemno hitro se razvijajoča multidisciplinarna panoga (7, 8, 9).

1.2. NANOMEDICINA

Nanomedicina predstavlja eno izmed disciplin nanotehnologije, ki v zadnjem času zasluži posebno pozornost. Točne definicije tega pojma sicer še ni, a dandanes izraz nanomedicina uporabljamo za tisto vejo nanotehnologije, ki se ukvarja z razvojem zdravil in diagnostičnih sredstev osnovanih na delcih nanometerskih velikosti. The European Science Foundation je nanomedicino opisala kot »znanost in tehnologijo diagnosticiranja,

zdravljenja in preprečevanja bolezni z uporabo naprav nanometerskih velikosti ter razumevanja človeškega telesa na molekularni ravni« (9, 10, 11).

Na splošno lahko rečemo, da nanomedicina zajema naslednja področja:

- specifične oblike dostavnih sistemov,
- diagnosticiranje *in vitro*, *on vivo* in *in vivo*,
- regenerativno medicino,
- naprave za implantiranje (nanoroboti, itd.).

1.3. NANOVLAKNA

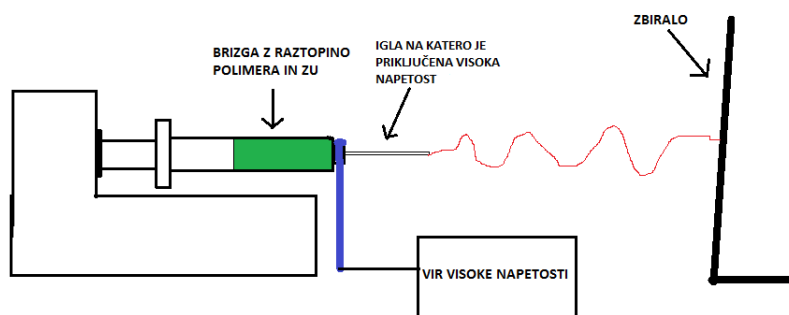
Nanovlakna so trenutno najsodobnejša oblika nanomaterialov, ki zaradi svojih lastnosti veliko obetajo, še zlasti v sodobni medicini. Po definiciji so to vlakna, katerih premer sega od nekaj nanometrov do največ mikrometra (najpogosteje med 50 in 500 nm). Izkazujejo edinstvene lastnosti, kot so ogromna specifična površina na enoto mase, visoka poroznost njihove mreže, odlične strukturne lastnosti, prožnost in majhno težo (9, 12).

Za pripravo nanovlaken je na voljo več različnih metod, vendar pa je tehnologija izbire metoda elektrostatskega sukanja, saj omogoča njihovo izdelavo iz raztopine naravnega ali sinteznega polimera, ob uporabi visoke električne napetosti. V teoriji z izbiro materiala nismo omejeni, kadar pa želimo nanovlakna koristiti v biomedicinske namene, mora izbrani material biti biokompatibilen, biorazgradljiv, netoksičen, poleg tega pa sta želeni tudi hidrofilnost in ustrezna mehanska trdnost. Nanovlakna so do sedaj izdelali že iz več kot 200 različnih polimerov, med njimi pa najpogosteje zasledimo polivinilalkohol (PVA), polietilen oksid, polimlečno kislino, kopolimer mlečne in glikolne kisline, polikaprolakton, hitosan, alginat, kolagen, želatino, hialuronsko kislino in druge (13, 14, 15).

1.4. METODA ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA

Elektrostatsko sukanje (ang. »electrospinning«) je tehnološki proces, s katerim danes najpogosteje izdelujejo nano- in mikrovlakna. Tipična naprava za elektrostatsko sukanje je sestavljena iz 3 delov (Slika 1):

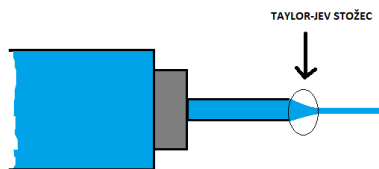
- 1.) igle, skozi katero s pomočjo črpalke teče polimerna raztopina za elektrostatsko sukanje s konstantno hitrostjo,
- 2.) izvora visoke napetosti, s katerim povečamo električni naboj, in
- 3.) ozemljenega zbiralca, ki je najpogosteje aluminijasta folija, nameščena na ustrezno stojalo (13, 14, 15, 16, 17).



Slika 1: Shema osnovnih gradnikov naprave za elektrostatsko sukanje

Za pripravo nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja napolnimo brizgo s kovinsko iglo s polimerno raztopino (uporabimo lahko tudi talino) in jo vpneemo v črpalko, ki zagotavlja konstantno hitrost pretoka. Na iglo pa s pomočjo priponke »krokodilčka« priključimo še izvor visoke napetosti. Raztopina polimera skozi iglo sprva le kaplja, priključitev visoke napetosti (nekaj kV) pa vanjo uvede električni naboj, ta pa zaradi privlaka nasprotno nabitega oziroma ozemljenega zbiralca povzroči preoblikovanje kapljice v t.i. Taylor-jev stožec (Slika 2). Ko so sile električne napetosti dovolj visoke, da presežejo sile površinske napetosti raztopine, se iz konice stožca sproži tanek curek raztopine. Ta nato potuje po zraku v električnem polju do zbiralca. Na tej poti se razteguje in je podvržen

številnim nestabilnostim, hkrati pa izhlapi topilo, zato dobimo na zbiralu suha vlakna nanometrskih velikosti (13, 14, 15).



Slika 2: Prikaz nastanka Taylor-jevega stožca

Za uspešen postopek elektrostatskega sukanja in s tem tvorbo gladkih nanovlaken ustreznih dimenzij, moramo biti pozorni na številne, medsebojno odvisne dejavnike. Njihova neprimerna izbira namreč lahko povzroči tvorbo vozlov, prekine curek ali vodi v nastanek kapljic. V osnovi delimo dejavnike v tri skupine (13, 14, 15):

- **Dejavniki raztopine:** koncentracija polimera, viskoznost, površinska napetost in prevodnost raztopine, molekulska masa polimera, hlapnost in dielektrična konstanta topila.
- **Dejavniki procesa:** hitrost pretoka skozi iglo, uporabljena električna napetost, razdalja med konico igle in zbiralom ter struktura, oblika in gibanje zbirala.
- **Dejavniki okolja:** temperatura in relativna vlažnost prostora, v katerem izdelujemo nanovlakna.

1.4.1. Dejavniki raztopine

Koncentracija

Koncentracija polimera v raztopini odloča ali bodo rezultat elektrostatskega sukanja nanovlakna ali ne. Pri tem mora biti dovolj visoka, da se tvori stabilen in neprekinjen curek, po drugi strani pa ne sme biti previsoka, saj bi bil v tem primeru onemogočen konstanten pretok skozi iglo zaradi visoke viskoznosti raztopine. Za vsak sistem polimer/topilo obstaja območje optimalne koncentracije, pri kateri je v notranjosti raztopine ravno dovolj prepletov polimernih verig, ki omogočajo tvorbo, neprekinjenost in

ustrezno raztegovanje curka. Če še višamo koncentracijo, lahko to moti nastanek nanovlaken, v vsakem primeru pa nastanejo vlakna z večjimi povprečnimi premeri (13, 14, 15).

Viskoznost

Viskoznost raztopine je tesno povezana s koncentracijo polimera in v splošnem z njenim večanjem narašča. Prav tako kot za koncentracijo tudi za viskoznost velja, da mora za uspešno pripravo nanovlaken biti v optimalnem intervalu, njeno povečevanje pa ima za posledico večji premer vlaken, a tudi manjšo pojavnost vozlov (13, 14, 15, 18).

Površinska napetost

Natančno določenih spoznanj o vplivu površinske napetosti na morfologijo nanovlaken v literaturi sicer ni moč zaznati, velja pa, da previsoka površinska napetost negativno vpliva na proces elektrostatskega sukanja. Kot taka namreč povzroči nestabilnost curka in njegovo razbitje na kapljice, poleg tega pa zahteva uporabo višje električne napetosti, kar zmanjša varnost pri delu (13, 14, 15).

Prevodnost raztopine

Prevodnost raztopine pomembno vpliva na nastanek nanovlaken, saj določa velikost elektrostatskih odbojnih sil v curku in s tem velikost vlaken. V splošnem velja, da večja kot je prevodnost uporabljenih polimernih raztopin, tanjša in gladkejša bodo nanovlakna (13, 14, 15).

Molekulska masa polimera

Molekulska masa polimera ima velik vpliv na lastnosti raztopine, med njimi tudi na viskoznost, površinsko napetost in prevodnost, zato je eden pomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na morfologijo izdelanih vlaken. Premajhna molekulska masa polimera lahko povzroči tvorbo vozlov, z njenim povečevanjem pa lahko tvorimo bolj gladka in debelejša nanovlakna (13, 14, 15, 19).

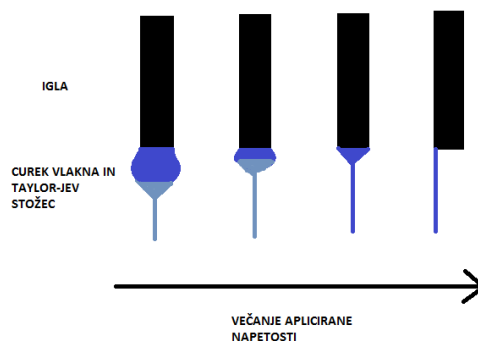
Hlapnost topila

Pri topilih, predvsem organskih, ki so bolj hlapna, je potrebno med procesom elektrostatskega sukanja zagotoviti večjo hitrost pretoka, saj se le na ta način izognemo tvorbi vozlov (13, 14).

1.4.2. Dejavniki procesa

Uporabljena napetost

Uporabljena električna napetost je najpomembnejši procesni dejavnik. V kolikor je prenizka, sploh ne pride do tvorbe curka in posledično do nastanka. Višja napetost pa ima v splošnem za posledico nastanek gladkejših in tanjših nanovlaken. Uporabljena napetost lahko vpliva tudi na mesto nastanka curka na konici igle in posledično na tvorbo vozlov. Po apliciranju napetosti na iglo se najprej tvori kapljica polimera, na njenem koncu pa nastane Taylor-jev stožec, iz katerega izhaja curek polimera. Z višanjem napetosti se velikost kapljice na konici zmanjšuje, zato se Taylor-jev stožec bliža konici igle. Zaželeno je, da Taylor-jev stožec izhaja neposredno iz konice igle, kar omogoča tvorbo gladkih vlaken. Z dodatnim zvišanjem napetosti, pa ni več tvorbe Taylor-jevega stožca, zato curek polimerne raztopine izhaja neposredno iz konice igle, to pa povzroči nastanek vozlov (13, 14, 15).



Slika 3: Prikaz spremembe polimernega curka z višanjem napetosti

Razdalja med konico igle in zbiralom

Razdalja med konico igle in zbiralom mora biti takšna, da ima vsak novonastali curek oziroma vsako vlakno dovolj časa, da se popolnoma posuši. Če je namreč razdalja premajhna, topilo ne izhlapi in na zbiralu dobimo le mokro liso oziroma pride lahko tudi

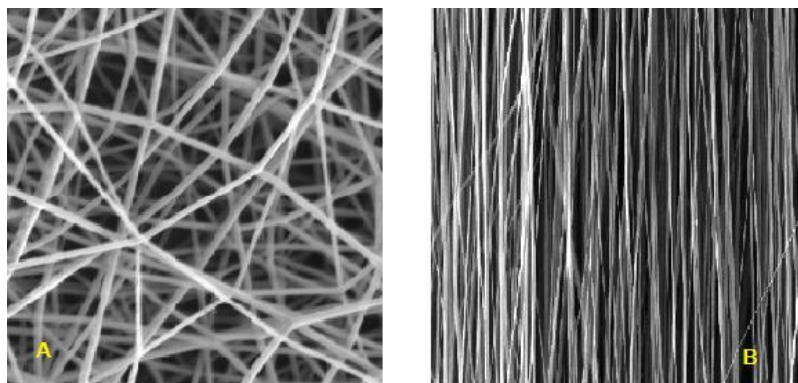
do tvorbe kapljic. Po drugi strani pa razdalja seveda tudi ne sme biti tako velika, da bi zaradi šibkega električnega polja zbiralo ne moglo pritegniti curka nase in bi se zato na poti ta izgubil oziroma še pred zbiralom (13, 14, 15).

Hitrost pretoka skozi iglo

Hitrost pretoka polimerne raztopine skozi iglo vpliva na hitrost curka, čas izhlapevanja topila ter količino prenesenega materiala na zbiralo. Ob previsoki hitrosti pretoka lahko pride do tvorbe kapljic, saj ima topilo v tem primeru premalo časa, da bi popolnoma izhlapelo. Zniževanje hitrosti pa vodi v nastanek tanjših vlaken (13, 14, 15).

Oblika zbiralca

Zbiralo je del, na katerem se zberejo nastala nanovlakna, za sklenitev električnega polja pa mora biti prevodno. Najenostavnejša in najpogostejše uporabljana je ploščata aluminijasta folija, nameščena na nosilec. Nanovlakna zbrana na foliji so razporejena neorganizirano, v vseh smereh, ob dovolj debelem nanosu pa jih lahko enostavno odstranimo kot belo statično opno oziroma membrano. Vse pogostejše kot zbirala uporabljajo rotirajoče valje, ki omogočajo nastanek v eni smeri urejenih nanovlaken (Slika 4). Urejena nanovlakna so uporabnejša, saj njihova urejenost pozitivno vpliva tako na njihove mehanske lastnosti kot tudi na adhezijo, proliferacijo in poravnavo celice. Xu in sod. so izdelali dostavne sisteme z različno urejenimi nanovlakni, nato pa so na njih opazovali obnašanje mišičnih celic koronarnih arterij *in vitro*. Ugotovili so, da potekata v primeru urejenih nanovlaken adhezija in proliferacija celic hitreje in bolje, v primerjavi z neurejenimi (13, 14, 15).



Slika 4: Neurejena (A) in urejena (B) nanovlakna

1.4.3. Dejavniki okolja

Poleg procesnih dejavnikov in dejavnikov raztopine, lahko tudi dejavniki okolja, čeprav v manjši meri vplivajo na strukturo in morfologijo nastalih vlaken oziroma na celoten proces elektrostatskega sukanja. Eden pomembnejših dejavnikov je temperatura okolja. Ugotovili so, da njeno višanje zmanjšuje premer nastalih vlaken, kar je posledica zmanjševanja viskoznosti polimerne raztopine. Drugi pomemben dejavnik okolja je relativna vlažnost. Pri nizki vlažnosti okolja je izhlapevanje topila hitrejše, zato se po eni strani novo nastala vlakna hitreje sušijo, po drugi strani pa ob prehitrem izhlapevanju lahko pride do zamašitve igle (14, 15).

1.5. UPORABNOST NANOVLAKEN NA PODROČJU BIOMEDICINE

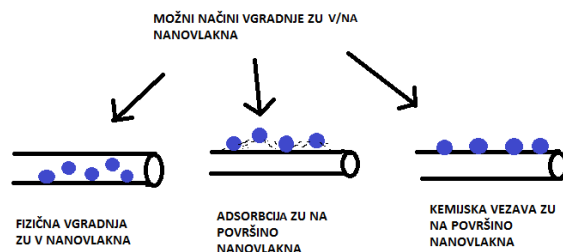
Glede na literaturni pregled lahko raziskave na področju izdelave nanovlaken za uporabo v sodobni medicini, strnemo v tri glavne skupine, in sicer so tiste, ki razvijajo nanovlakna kot nove dostavne sisteme za vnos različnih zdravilnih učinkovin; tiste, ki jih uporabljajo kot tkivne nadomestke, in tiste, katerih glavni cilj so nanovlakna kot obloge za izboljšano celjenje ran. Še zlasti v prvi skupini so danes študije izredno intenzivne, saj standardne peroralne in parenteralne aplikacije nekaterih zdravilnih učinkovin ne zagotavljajo učinkovite terapije z njimi. Dejansko vedno več molekul zahteva večjo pozornost glede njihove dostave. Pogosto zaradi njihove občutljive narave zlahka pride do hitre razgradnje in izločanja iz organizma, tvorjenja neželenih toksičnih produktov in pojava neželenih učinkov, kar ima za rezultat neuspešno zdravljenje, visoke stroške terapije in nezadovoljstvo pacientov. Rešitev tega problema predstavlja med drugim razvoj novih dostavnih sistemov, s katerimi bi lahko izboljšali biološko razpoložljivost zdravilnih učinkovin, njihove koncentracije ohranjali v ustreznem območju, vplivali na oziroma dosegali ustrezne profile njihovega sproščanja, zmanjšali stranske učinke ter dosegli njihovo ciljano dostavo na obolela mesta (11, 12, 15, 20).

Za doseganje optimalnega delovanja dostavnih sistemov moramo biti pozorni na naslednje lastnosti osnovnih gradnikov, iz katerih so sestavljeni (21):

- **Velikost osnovnih gradnikov in razporeditev velikosti** sta najpomembnejši za izdelavo dostavnih sistemov. Vplivata na to, kako se bo sistem obnašal v organizmu, kje se bo nalagal, na biološko razgradnjo, toksičnost in sposobnost njihove vezave na želeno mesto. Posledično lahko vplivata na sproščanje in zadrževanje zdravilne učinkovine v določenem delu organizma.
- **Površinske lastnosti osnovnih gradnikov** vplivajo na zadrževanje dostavnega sistema v organizmu. Za preprečitev hitrega izločanja hidrofilnih učinkovin pogosto namesto hidrofilnih uporabijo hidrofobne polimere in obratno.
- **Vgradnja učinkovine**; kakovosten dostavni sistem mora imeti visoko sposobnost za vgradnjo učinkovine, ker je odvisna predvsem od topnosti učinkovine v polimeru in od interakcij med učinkovino in polimerom.
- **Sproščanje učinkovine**; določajo lastnosti polimernega ogrodja, topnost učinkovine v njem ter sposobnost njihove difuzije skozenj, zmožnosti erozije oziroma razgradnje dostavnega sistema in kombinacije teh procesov. S primernim optimiziranjem lahko dosežemo tudi zakasnjeno oziroma kontrolirano sproščanje učinkovine.

Nanovlakna lahko služijo kot dostavni sistemi za vnos številnih različnih zdravilnih učinkovin. Tako so že izdelali nanovlakna z antibiotiki, nesteroidnimi antirevmatiki, protitumorskimi učinkovinami, proteini in DNA (11, 21, 22). Zdravilne učinkovine so vanje vgradili na različne načine, odvisno predvsem od tega, kakšne lastnosti so imele molekule učinkovin in kako hiter učinek so želeli doseči. Najpogostejši način je vgradnja učinkovine v notranjost nanovlaken, izvedemo pa lahko tudi njeno adsorpcijo ali kemijsko vezavo na površino nosilca (Slika 5). Prvi način, ki omogoča največji nadzor nad sproščanjem vgrajene učinkovine, je hkrati tudi najlažji za pripravo, saj učinkovino enostavno raztopimo v raztopini polimera, ki jo uporabimo za elektrostatsko sukanje. Adsorpcijo učinkovine izvedemo tako, da izdelana polimerna vlakna namakamo v raztopini učinkovine, iz katerih se nato z elektrostatičnimi interakcijami veže na njihovo površino. Pri tako izdelanih vlaknih pa je težko modificirati vezavo in nadzirati sproščanje učinkovine, zato ga v farmaciji redkeje uporabljamo. Tretji način, torej kemijsko vezavo učinkovine s tvorbo kovalentnih vezi med njo in površino nanovlaken, pogosteje kot za dostavo zdravil uporabljamo za spreminjanje površinskih lastnosti dostavnega sistema.

Vezana substanca se v tem primeru sprosti šele po encimski ali hidrolitični razgradnji omenjenih vezi (14).



Slika 5: Možni načini vgradnje zdravilnih učinkovin v nanovlakna

Nanovlakna izdelana z metodo elektrostatskega sukanja so prav tako kot za dostavne sisteme vedno bolj zanimiva tudi na področju izdelave sodobnih oblog za rane. To področje obsega znanje medicine, biologije in inženirstva, kjer se raziskovalci trudijo izdelati obloge, ki bi aktivno posegale v proces regeneracije. Ker je ob nastanku rane integriteta kože prekinjena, morajo aplicirane obloge pogosto začasno prevzeti vlogo manjkajočega tkiva, torej delovati kot opora in zaščita, ki celice varuje pred izsušitvijo, temperaturnimi razlikami, okužbo ali nadaljnjo mehansko poškodbo (23, 24). Inženirji morajo zato pri izdelavi oblog zadovoljiti številne zahteve, zapisane v nadaljevanju, da bi dosegli čim bolj optimalno celjenje: (23, 25, 26):

- obloga mora podpirati in pospeševati naravne procese celjenja, pri tem pa se ne sme spojiti z rano in povzročati bolečine ob njeni menjavi;
- obloga mora vzdrževati vlažno okolje in vlažen stik rana-obloga ter ustrezno temperaturo, pri tem pa ne sme povzročati mehčanja kože okrog rane oziroma kakršne koli alergijske reakcije;
- obloga mora ustrezno vpijati izcedke in škodljive snovi, hkrati pa omogočiti prehod plinov ter dihanje rane; preprečiti mora tudi prehod tekočin, izločkov in bakterij, s čimer zaščiti rano pred okužbo.

Nanovlakna predstavljajo strukturo, ki na tem področju največ obeta, saj omogoča najbolj pristno posnemanje zunajceličnega ogrodja človeškega tkiva in zagotavlja vlažno

mikrookolje; poleg tega je izdelava nanovlaken hitra in poceni, pri čemer lahko vplivamo na številne procesne dejavnike, da zagotovimo njihove čim bolj optimalne lastnosti (25, 26).

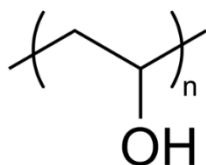
Shalumon in sod. so izdelali nanovlakna iz alginata in PVA, vanje so vgradili ZnO, ter tako pridobili obloge za rane z antibakterijskim učinkom. Opazovali so učinkovitost ZnO kot antibakterijske učinkovine v različnih koncentracijah in ugotovili, da z višanjem njihove koncentracije antibakterijski učinek ne narašča. Poleg tega so pokazali, da bi bil ZnO kot učinkovina zelo uporaben v oblogah za rane, vendar pa bi morali najprej ugotoviti območje koncentracij, pri katerih je njegovo delovanje najbolj optimalno (27).

Kim in sod. so ugotavljali kako usmerjenost in gostota nanovlaken vplivata na hitrost celjenja ran. Ugotovili so, da sta oba dejavnika pomembna. Za usmerjanje celic in posledično za celjenje. V primeru, ko so bila vlakna postavljena vertikalno glede na lego celičnih kultur, je bilo celjenje hitrejše in že v 48 urah popolno. Ko pa so jih usmerili paralelno glede na lego celičnih kultur, pa je bilo celjenje občutno počasnejše, saj po 48 urah rana še ni bila popolnoma zaraščena (28).

Zanimanje za to področje je iz dneva v dan večje. Raziskovalci bodo morali tako v prihodnje veliko energije in znanja vložiti v izdelavo takih oblog in dostavnih sistemov, ki bodo, poleg že doseženih ustreznih mehanskih lastnosti in ustrezne strukturne podpore, morali zagotoviti vodenje in nadzor celične migracije, proliferacije in diferenciacije (29).

1.6. POLIVINILALKOHOL

Polivinilalkohol (PVA) je polimer sinteznega izvora, v obliki belih zrn, brez vonja in okusa (Slika 6). Je vodotopen polimer, ki pa ga moramo segreti na približno 90 °C (temperatura tališča). Je delno topen v alkoholu in netopen v ostalih organskih topilih. Kakšne fizikalno-kemijske lastnosti bo imel, pa je odvisno od stopnje njegove polimerizacije in hidrolize. Odlikujejo ga številne pozitivne lastnosti kot so: biorazgradljivost, netoksičnost, nekarcinogenost, biološka kompatibilnost in ustrezne mehanske lastnosti (17). Prav zaradi vsega tega je tudi eden izmed prvih in še vedno zelo pogosto uporabljen polimer za izdelavo nanovlaken.



Slika 6: Struktura molekule PVA

Won Keun in sod. so raziskali vpliv različnih vrednosti pH na strukturo in morfološke lastnosti vlaken iz PVA ter ugotovili, da se z višanjem pH tvorijo tanjša in bolj gladka vlakna, medtem ko v kislem območju nastajajo vozli. Pri nižjih vrednostih pH je bil tudi sam proces elektrostatskega sukanja zaradi protonacije PVA otežen (30). Tao je s sod. ugotovil, da se pri konstantni koncentraciji PVA, s povečanjem molekulske mase polimera struktura vlaken spreminja iz kapljic preko vlaken z vozli, do gladkih vlaken. Pri zelo visoki molekularni masi pa so nastala vlakna podobna sploščenim trakovom (19).

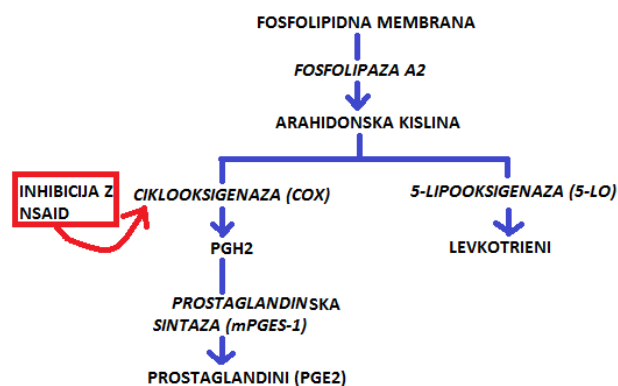
Dongzhi in sod. pa so v raziskavi pripravili nanovlakna iz želatine in PVA, ter ugotovili da, večji kot je njegov delež v zmesi, boljše lastnosti imajo nanovlakna (t.j. večji premer, večjo prožnost, večjo natezno trdnost), ki so zato bolj uporabna za dostavne sisteme (31).

1.7. NESTEROIDNI ANTIREVMATIKI (NSAID)

Nesteroidni antirevmatiki (NSAID) so zdravilne učinkovine z izraženim protivnetnim, analgetičnim ter antipiretičnim delovanjem in so ena izmed najpogosteje uporabljenih skupin zdravil. Mednje sodijo ibuprofen, naproksen, celekoksib, ketoprofen, acetilsalicilna kislina, fenilbutazon in številne druge zdravilne učinkovine.

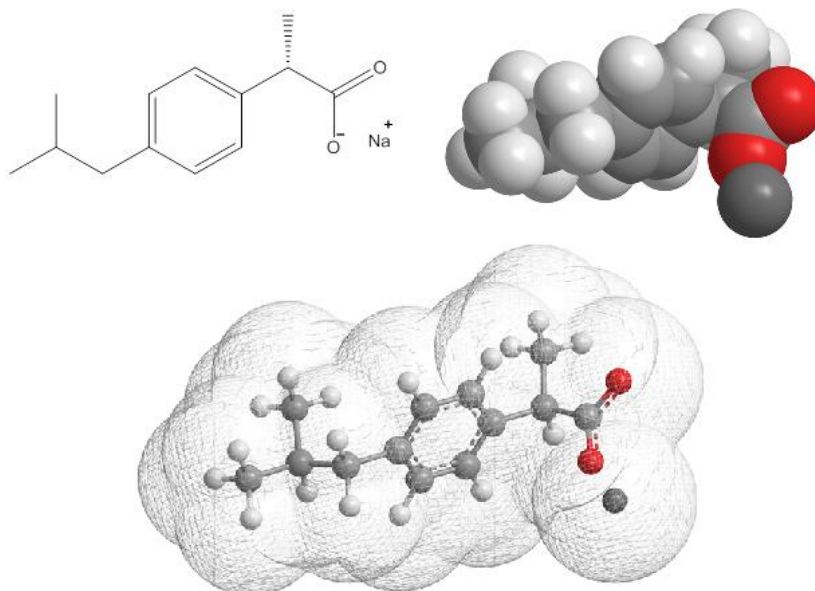
Delujejo tako, da inhibirajo delovanje encima ciklooksigenaza (COX-1, COX-2), katere naloga je pretvorba arahidonske kisline, ki deluje kot prekursor v sintezi eikozanoidov in kot sekundarni obveščevalec, v prostaglandine in levkotriene. Ob prisotnosti hema in kisika, COX-1 in COX-2, oksidirata arahidonsko kislino do cikličnega endoperoksida PGG₂, tega pa nato cepita s peroksidazno aktivnostjo do cikličnega endoperoksida PGH₂. Ta pa je prekursor za različne prostaglandine. Inhibitorji COX, se vežejo na aktivna mesta encimov in tako preprečijo njihovo delovanje. Prostaglandini in levkotrieni so vključeni v številne fiziološke in patofiziološke procese, kot so vnetje, hemostaza, tromboza, citoprotektivno delovanje, hemodinamika, hiperalgezija, višanje telesne temperature, itd. Z

njihovim zaviranjem dosežemo poleg drugih, tako želenih kot neželenih učinkov, tudi protivnetno, analgetično in antipiretično delovanje (slika 7).



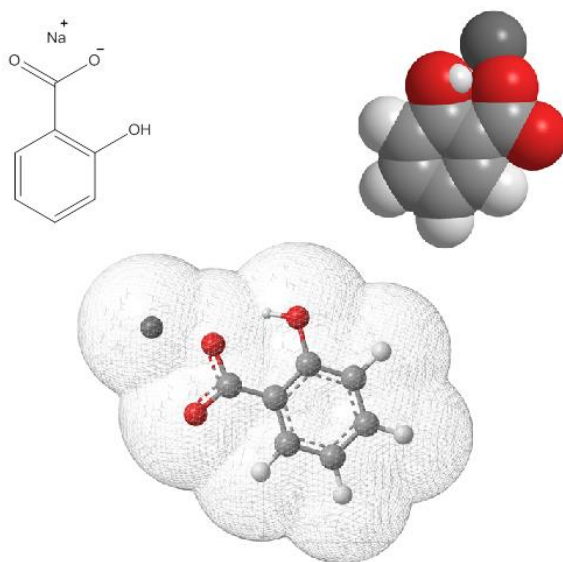
Slika 7: Shema nastanka vnetnih mediatorjev in mesto delovanja NSAID

V diplomskem delu smo uporabili tri učinkovine iz skupine NSAID, in sicer natrijeve soli naproksena, ibuprofena in salicilne kisline za preučevanje njihove vgradnje v in sproščanje iz nanovlaken, izdelanih iz PVA.



Slika 8: Struktura molekule natrijevega ibuprofenata

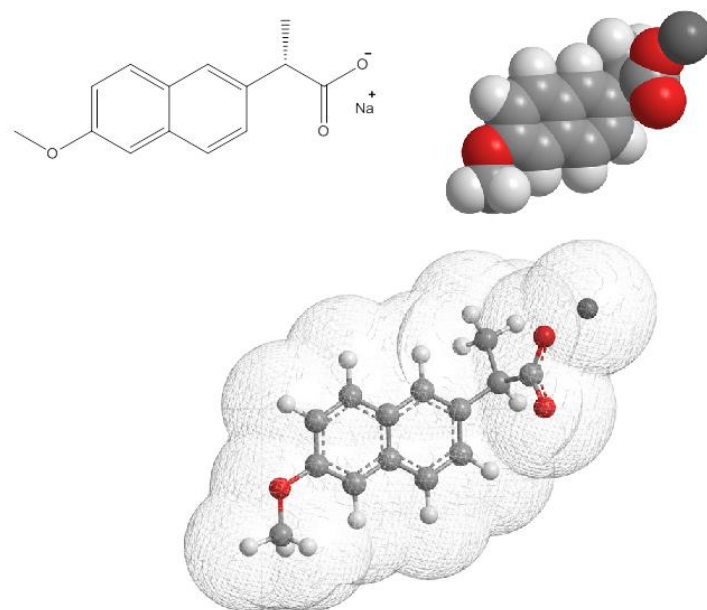
Ibuprofen ali 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanojska kislina je bel prašek, slabo topen v vodi. Njegova aktivna oblika je (S)-enantiomer, do sedaj pa so v večini raziskav ibuprofen vgrajevali v nanodelce (32). Prav zaradi slabe topnosti se pogosto uporablja njegova natrijeva sol. Ta ima obliko belega kristaliničnega praška, brez vonja in okusa, v vodi pa se topi bistveno bolje kot sam ibuprofen. Alf in sod. so ibuprofen vgradili v trdne lipidne nosilce in ugotovili, da se ga lahko uporablja tako oralno kot intravensko za lajšanje bolečin po operativnih posegih. Njegovo sproščanje iz omenjenega sistema pa je bilo zakasnjeno zato je bil učinek podaljšan (33). Sergio in sod. so v svoji študiji pokazali, da je možno nanodelce iz ibuprofena in PVA izdelati z uporabo treh različnih metod, ki so vse z razmeroma majhnimi spremembami vrednosti delcev prenosljive iz laboratorijskega na industrijski nivo (34).



Slika 9: Struktura molekule natrijevega salicilata

Salicilna kislina ali 2-hidroksibenzojska kislina je pomemben presnovek acetilsalicilne kisline. Je bel kristalinični prašek, brez vonja in je slabo topna v vodi. Ker poleg analgetičnega učinka povzroča tudi številne stranske učinke kot so, bruhanje, glavobol, krvavitve v prebavnem traktu, zvonjenje v ušesih, itd., se pogosteje uporablja acetilsalicilna kislina. Vezava očetne kisline na salicilno namreč omili omenjene stranske učinke. V industriji spojino uporabljajo za nadaljnjo sintezo zdravil. V pripravkih za kožo je lahko

vgrajena v koncentracijah od 1 do 3 %, pri čem deluje antiseptično, protivnetno in keratoplastično (pospešuje poroženevanje kože), pri višjih koncentracijah pa je njeno delovanje keratolitično (lušči poroženele plasti pokožnice). Natrijeva sol salicilne kisline, ki smo jo uporabljali pri našem eksperimentalnem delu, je prav tako bel kristaliničen prašek, brez vonja in z dobro topnostjo v vodi. Konkretnih raziskav o vgradnji salicilne kisline v delce nanometerskih velikosti v literaturi nismo zasledili (35).



Slika 10: Struktura molekule natrijevega naproksenata

Naproksen ali 2-(6-metoksinaftalen-2-il) propionska kislina je tako kot ibuprofen, aktivna v obliki S-enantiomera. Je bel kristalni prašek, brez vonja ki je netopen v vodi (36). Njegova topnost pa se izredno poveča s tvorbo natrijeve soli. Ta je prav tako bel prašek, brez vonja, ki pa kljub boljši vodotopnosti v večjih koncentracijah tvori mlečno raztopino. V raziskavah so že proučevali strukturne lastnosti nanodelcev izdelanih iz PLGA in naproksena ter ugotovili, da z vplivanjem na različne dejavnike kot so razmerje učinkovina/polimer, volumen vodne faze in hitrost homogenizacije, lahko izdelamo delce želenih velikosti (37).

2. NAMEN DELA

Nanovlakna postajajo vedno bolj zanimiva na področju izdelave sodobnih oblog za rane. Veliko obetajo prav zaradi svoje strukture, saj najbolj pristno posnemajo tkivno zunajcelično ogrodje, poleg tega pa zagotavljajo tudi vlažno okolje in so z vidika stroškov izdelave poceni.

V raziskovalnem delu diplomske naloge bomo nadaljevali raziskave opisane v diplomskem delu A. Zupančič, v katerem so ugotavljali vpliv dodanih natrijevih soli naproksena, ibuprofena in salicilne kisline, na fizikalno-kemijske lastnosti vodnih raztopin PVA. Ugotovili so, da vgrajene učinkovine vplivajo na prevodnost, gostoto, površinsko napetost in viskoznost raztopine PVA. S povišanjem koncentracije dodane soli linearno naraščata gostota in prevodnost posamezne raztopine. Tako so najvišje vrednosti zabeležili v primeru natrijevega salicilata, sledil je natrijev naproksenat, nato natrijev ibuprofenat. Ob dodatku natrijevih soli naproksena in salicilne kisline, niso ugotovili bistvenih vplivov na površinsko napetost, medtem ko se je njena vrednost po dodatku natrijevega ibuprofenata opazno znižala. Prav tako so ugotovili, da se je viskoznost povečala po dodatku vsake od treh soli, in sicer v območju njihovih nižjih koncentracij (do 1 %), nato pa je upadla (pri 3 %) in se ponovno povečala pri višjih koncentracijah.

V diplomskem delu bomo najprej izdelali 8 % raztopino PVA, saj se je ta v predhodnih raziskavah na UL-Fakulteti za farmacijo izkazala za najbolj optimalno pri izdelavi nanovlaken. Vanjo bomo nato vgradili natrijeve soli vsake od treh učinkovin iz skupine NSAID, in sicer naproksena, ibuprofena in salicilne kisline, v 4 različnih koncentracijah, 1, 5, 10 in 20 % (m/m). Iz raztopin učinkovin in polimera bomo izdelali nanovlakna z metodo elektrostatskega sukanja.

Izdelana nanovlakna bomo vrednotili z analizo SEM, na posnetkih pa opazovali morfologijo in izmerili njihove povprečne premere. Poskušali bomo ugotoviti kako različne vsebnosti učinkovin in različni načini njihovega vgrajevanja vplivajo na povprečni premer in obliko nanovlaken. Za ugotavljanje povprečnih premerov bomo uporabili računalniški program ImageJ, pri čemer bomo izmerili premer 50-ih vlaken v vsakem posameznem vzorcu.

Ugotavljali bomo tudi kako se učinkovina iz nanovlaken sprošča v določenem časovnem obdobju. V ta namen bomo pripravili 3 paralelke za vsak posamezen vzorec in vzorčili v različnih časovnih intervalih, na začetku bolj pogosto (prvih 8 ur), nato pa na 24 ur v obdobju 5 dni. Za ugotavljanje sproščanja zdravilne učinkovine bomo uporabili fosfatni pufer, ki predstavlja enega glavnih pufrov v organizmu, saj pomembno vpliva na uravnavanje pH v celicah. S pomočjo grafov bomo nato primerjali profile sproščanja posameznih učinkovin glede na njihovo vsebnost v/nanovlaknih ter tudi učinkovin med seboj.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Polimer, topilo in zdravilne učinkovine:

- Polivinilalkohol Mowiol® 20 – 98, M=125 000 g/mol, stopnja polimerizacije: 2800 in hidrolize: 98,0 – 98,8 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija;
- Prečiščena voda;
- Natrijev salicilat (>99,8%) , M=160,11 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija;
- Natrijev ibuprofenat, M=228,29 g/mol, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemčija;
- Natrijev naproksenat, (98,0-102,0%), M=252,2 g/mol, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemčija.

3.1.2. Reagenti za pripravo fosfatnega pufra s pH 7,4

- Natrijev klorid, M=58,44 g/mol, Merck KGaA, Nemčija;
- Kalijev klorid, M=74,55 g/mol, Merck KGaA, Nemčija;
- Dinatrijev hidrogenfosfat, M=141,96 g/mol; Merck KGaA, Nemčija;
- Kalijev dihidrogenfosfat, M=136,09 g/mol;
- Klorovodikova kislina 37%, Panreac Quimica S.A.U., Španija;
- Natrijev hidroksid, M=40 g/mol, Merck KGaA, Nemčija;
- Prečiščena voda.

3.2. APARATURE ZA IZDELAVO NANOVLAKEN

- ❖ Analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica;
- ❖ Digitalna tehtnica, Sartorius M-pact, Sartorius Group;
- ❖ Krovna stekelca (22 x 22 mm);
- ❖ Magnetno mešalo, Rotamix 560 MMH, Tehnica, Železniki, Slovenija;

- ❖ Mešalo, Vibromix 403EVT, Tehnica, Železniki, Slovenija;
- ❖ Mikrotitrne plošče BRANDplates pureGrade™, Brand GmbH, Wertheim Nemčija;
- ❖ Naprava za elektrostatsko sukanje:
 - 20 mL brizga, B-Braunn, ZDA;
 - Kovinska igla z notranjim premerom 0,8 mm, Linari Engineering, Italija;
 - Črpalka, Razel TM, Ma R-99E, Italija;
 - Generator visoke napetosti, Linari Engineering s.r.l., Ma. P60-R-EU, Italija;
 - Aluminijasta folija nameščena na plastični nosilec, kot planarno zbiralo;
- ❖ Obojestranski lepilni prevodni trak, s premerom 12 mm, Oxon, Oxford instruments, Velika Britanija;
- ❖ pH meter Metter Toledo, Seven Compact, Švica;
- ❖ Pipete: 20-200 μ L; 500-5000 μ L; 1000 μ L;
- ❖ Računalniški program ImageJ, Image Processing and Analyzing in Java; 1. 44p, NIH, ZDA;
- ❖ Spektrofotometer, Hewlett Packard 8453, Agilent Technologies, Nemčija;
- ❖ Steklene čaše, 25 mL, Kimble;
- ❖ Suhi sterilizator, SE-02, Elektromedicina, Hrvaška;
- ❖ Spektrofotometer, Tecan, Safire 2, Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica;
- ❖ Vrstični elektronski mikroskop (mikroskop SEM) SEM Supra 35 VP, Oberkochen, Zeiss, Nemčija.

3.3. POSTOPEK IZDELAVE NANOVLAKEN

3.3.1. Priprava raztopine PVA

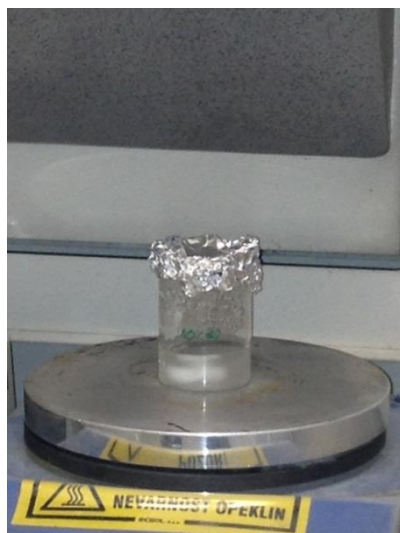
Za pripravo 8 % (m/m) raztopine PVA smo najprej pripravili 12 % (m/m) raztopino, ki smo jo nato ustrezno redčili s prečiščeno vodo z ali brez dodatka ustrezne učinkovine. Za tak postopek smo se odločili, ker se PVA pri višji koncentraciji hitreje in bolje raztaplja, poleg tega pa na ta način zdravilnih učinkovin nismo izpostavili povišani temperaturi. Najprej smo natehtali ustrezno količino polimera PVA v prahu, ga kvantitativno prenesli v stekleno čašo, mu dodali prečiščeno vodo in čašo pokrili z aluminijasto folijo. Tako pripravljeno vsebino smo na magnetnem mešalu 2-3 ure segrevali pri približno 90 °C, vse

dokler delci polimera niso bili več vidni in je raztopina postala bistra. Ohlajeno raztopino PVA smo nato redčili z dodajanjem ustreznega koncentrata posamezne učinkovine tako, da smo dobili 8 % (m/m) raztopino PVA, z želenim deležem posamezne učinkovine.

3.3.2. Priprava raztopin učinkovin, polimera in koncentrata

Koncentrati so koncentrirane raztopine, ki jih lahko redčimo na želeno koncentracijo, primerno za uporabo. Z njihovo pripravo skušamo zmanjšati količino uporabljenega materiala in pribora, prihraniti čas priprave posameznih raztopin, predvsem pa doseči večjo natančnost pri pripravi vzorcev. V našem primeru smo morali pripraviti nizke koncentracije vzorcev, pri čemer bi lahko prišlo do večjih odstopanj od želenih vsebnosti učinkovine in posledično do nenatančnih rezultatov. Zato smo se odločili za uporabo koncentratov. Za vsako preiskovano učinkovino smo pripravili 100 g koncentrata, v katerem smo raztopili določeno količino učinkovine. Količine smo spreminjali, in sicer od 1, 5, 10 do 20 % glede na maso polimera v disperziji. Najprej smo v čašo odtehtali ustrezno maso učinkovine, jo dopolnili do 100 g s prečiščeno vodo in mešali. Ker so bile vse uporabljene učinkovine v obliki natrijevih soli, so se v celoti in hitro raztopile. Tako pripravljene koncentrate smo nato uporabili za pripravo raztopin učinkovin in polimera. Primer: za pripravo 10 g raztopine z 8 % PVA in 5 % učinkovine smo potrebovali 800 mg PVA in 40 mg učinkovine. Najprej smo odtehtali 6,67 g 12 % raztopine PVA (tako smo dobili 8 % raztopino PVA). Razlika v masah do 10,0 g pa je predstavljala potrebno količino dodanega koncentrata, torej 3,33 g. V 3,33 g koncentrata je bilo torej raztopljene 40 mg učinkovine. Predhodno pripravljenih 100 g koncentrata je vsebovalo 1,2 g učinkovine.

Čašo smo nato pokrili s parafilmom in aluminijasto folijo ter jo pustili mešati 24 ur, da smo dosegli termodinamsko ravnotežno stanje.



Slika 11: Izgled raztopine PVA z učinkovino

3.3.3. Izdelava in stabilizacija nanovlaken

Polimerna nanovlakna iz PVA smo pripravili z metodo elektrostatskega sukanja, ob uporabi procesnih pogojev, ki so se v predhodno izvedenih raziskavah na Fakulteti za farmacijo izkazali kot najoptimalnejši. Postopek smo izvedli tako, da smo najprej plastično brizgo s kovinsko iglo napolnili s približno 5 mL raztopine PVA z ustrezno vsebnostjo učinkovine, iz nje iztisnili vse zračne mehurčke, nato pa jo povezali s črpalko, ki je zagotavljala konstantni pretok 0,8-1,0 mL/h. Zbiralo, narejeno iz aluminijaste folije pritrjeno na vertikalni plastični nosilec, smo postavili na oddaljenost 15 cm od konice igle. Na slednjo smo nato priključili izvor visoke električne napetosti 15kV. Na aluminijasto folijo smo z obojestranskim prevodnim lepilnim trakom prilepili krovna stekelca na katera so se med procesom elektrostatskega sukanja nabrala nanovlakna, ki smo jih uporabili za nadaljnja testiranja. Tako smo dosegli, da je bila na stekelcu vedno približno enaka količina nanovlaken, poleg tega pa je tudi bistveno lažje rokovanje z vzorci. V primeru, ko smo vzorce pripravljali za analizo SEM, smo elektrostatsko sukanje izvajali le 10 minut brez, v primeru priprave nanovlaken za preučevanje sproščanja učinkovine pa 60 minut, s krovnimi stekelci. Nanovlakna smo vedno 15 minut sušili pri sobni temperaturi, nato pa smo jih stabilizirali v suhem sterilizatorju tako, da smo stekelca pokrili z aluminijasto folijo in jih segrevali 30 minut na 160 °C. S tem smo dosegli manjšo hitrost njihovega raztapljanja v vodi.

3.3.4. Priprava fosfatnega pufru s pH=7,4

Za pripravo fosfatnega pufru smo v 1 L merilno bučko natehtali 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ in z prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Nato smo pripravili 0,1 M raztopini NaOH in HCl in z njima pH pufru uravnavali na 7,4. Pufer smo v nadaljevanju uporabljali za določanje sproščanja posameznih učinkovine iz nanovlaken. Za fosfatni pufer smo se odločili zato, ker predstavlja enega glavnih pufrskih sistemov v našem organizmu, saj je pomemben za uravnavanje vrednosti pH v celicah. S tem smo se želeli čim bolj približati fiziološkemu pogoju.

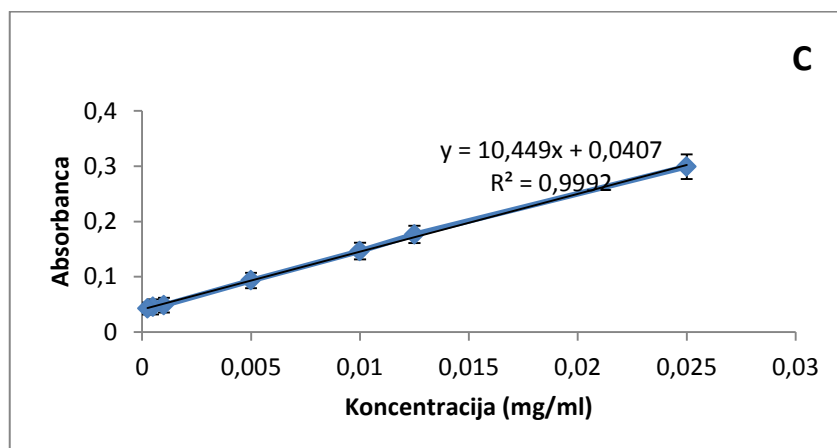
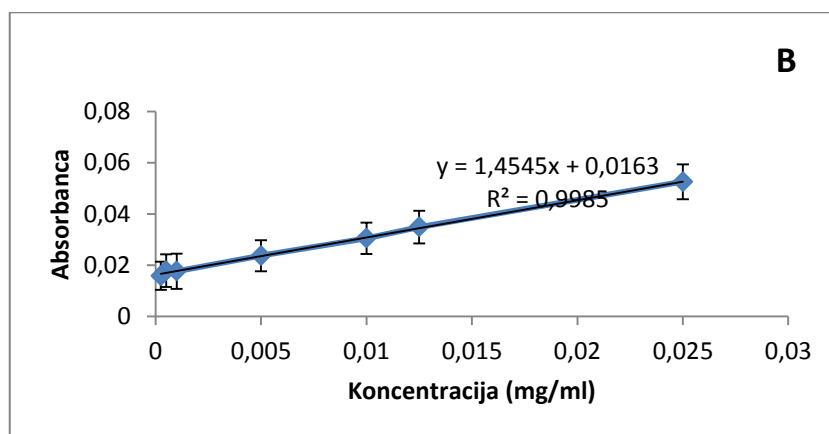
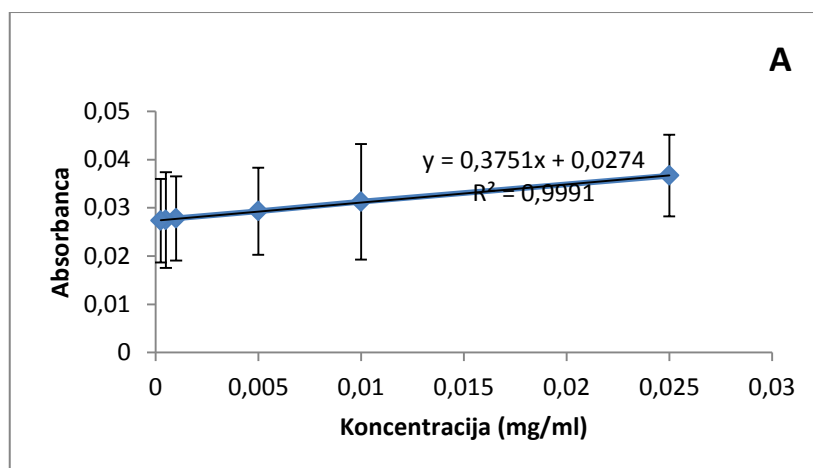
3.3.5. Izdelava umeritvenih premic za posamezne zdravilne učinkovine

Umeritvene premice za natrijev salicilat, natrijev ibuprofenat in natrijev naproksent smo pripravili iz njihovih osnovnih raztopin, v katerih je bilo 0,025 mg/ml posamezne učinkovine, in sicer tako, da smo natehtali po 12,5 mg vsake od preučevanih učinkovin in jih kvantitativno prenesli v 500 mL merilno bučko ter dopolnili do oznake s sveže pripravljenim fosfatnim pufrom. Osnovne raztopine posameznih učinkovin smo nato redčili tako, da smo dobili končne koncentracije 0,0125; 0,01; 0,005; 0,001; 0,0005 ter 0,00025 mg/ml. Z UV-VIS spektrofotometrom smo nato posneli absorpcijske spektre osnovnih raztopin za vsako posamezno učinkovino, z namenom da bi določili maksimume absorbanc. Te smo potrebovali pri merjenju koncentracij učinkovin z napravo Tecan, s katero smo izvajali vse ostale meritve. Za spektrofotometer Tecan smo se odločili zaradi večjega števila vzorcev, poleg tega pa smo jih vzorčili v mikrotitrne plošče, za kar smo potrebovali majhne volumne.

Z aparatom Tecan smo najprej izmerili absorbanco slepega vzorca v vdolbini mikrotitrne plošče, nato pa vanjo nanесли 100 µl vzorce predhodno pripravljenih razredčenih raztopin učinkovin v treh paralelkah in jim izmerili absorbance. Iz rezultatov meritev smo izračunali umeritvene premice za vsako posamezno učinkovino.

Enačbe za umeritvene premice:

- Natrijev ibuprofenat: $y = 0,3751x + 0,0274$ ($R^2 = 0,9991$) ;
- Natrijev naproksent: $y = 1,4545x + 0,0163$ ($R^2 = 0,9985$) ;
- Natrijev salicilat: $y = 10,449x + 0,0407$ ($R^2 = 0,9992$).



Slika 12: Umeritvene premice preiskovanih učinkovin: A - natrijev ibuprofenat, B - natrijev naproksenat, C - natrijev salicilat

3.4. VREDNOTENJE NANOVLAKEN

3.4.1. Proučevanje morfologije nanovlaken

Iz aluminijaste folije s stabiliziranimi nanovlakni smo izrezali približno 5 x 5 mm velike koščke in jih z obojestranskim lepilnim trakom prilepili na nosilce za analizo SEM. Vzorce smo analizirali z mikroskopom SEM pri pospeševalni napetosti 1 kV, ob uporabi sekundarnega detektorja in tako pridobili posnetke izdelanih vlaken. Iz njih smo nato z računalniškim programom ImageJ pri 50. 000-kratni povečavi identificirali morfologijo nanovlaken in določili njihov povprečni premer tako, da smo izmerili premer 50-ih naključno izbranih nanovlaknen in nato izračunali povprečni premer ter pripadajočo standardno deviacijo (SD).



Slika 13: Fotografija vzorcev nanovlaken za analizo SEM

3.4.2. Analiza sproščanja učinkovin iz nanovlaken

Cilj izdelave naših nanovlaken je bila izdelava učinkovite obloge za rane, iz katere bi se lokalno sproščala učinkovina, s čimer bi hkrati poskrbeli za izboljšanje celjenja in zmanjšanje bolečin. Ranjena koža je poškodovana, zato ni ovir, ki bi preprečevale vstop učinkovine neposredno v rano. Zato lahko ta s preprosto difuzijo prehaja na mesto delovanja. V želji da bi se čim bolj približali realni situaciji, smo za sproščanje učinkovin uporabili naslednji model: v 25 mL čaše z ravnim dnom smo položili krovna stekelca, na katerih so bila predhodno stabilizirana nanovlakna z različnimi vsebnostmi učinkovin. Dimenzija vzorca nanovlaken je bila 22x22 mm. Pri tem smo pazili da so bila stekelca obrnjena tako, da je bila stran z nanešenimi nanovlakni obrnjena navzgor. Nato smo v čaše nalili po 5 ml fosfatnega pufra s pH 7,4. Nato smo iz sredine medija v točno določenih

časovnih intervalih jemali po 100 μ l vzorca ki smo ga sproti nadomeščali z enako količino pufra. Odvzete vzorce smo vnesli v vdolbinice mikrotitrne plošče in jih kasneje tudi spektrofotometrično analizirali z aparatom Tecan. Časovni intervali jemanja vzorcev so bili: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 90; 105; 120; 180; 240; 300; 360; 420 in 480 min ter 24, 48, 72 in 96 ur. Sproščanje učinkovin je potekalo pri sobni temperaturi, med mešanjem, vzorce pa smo odvezemali v treh paralelah. Iz izmerjenih vrednosti absorbanc smo izračunali deleže iz nanovlaken sproščenih učinkovin, ob predpostavki da se je v 96 urah sprostila celotna količina vgrajene učinkovine (obloge za rane namreč največkrat menjujemo ravno po 96 urah). S pomočjo dobljenih vrednosti smo nato izračunali kumulativne deleže sproščenih učinkovin v različnih časovnih intervalih. Za izračun omenjenih deležev smo morali pred vsakim začetkom merjenja sproščanja posamezna stekelca z nanovlakni z vgrajeno učinkovino stehati, enako pa smo postopali tudi na koncu analize, pri čemer smo najprej pred tehtanjem vzorce sprali z vodo in izopropanolom, s čimer smo odstranili vsa nanovlakna. Za analizo odvzetih vsebnosti učinkovine v vzorcih smo uporabljali spektrofotometer Tecan, in pri vsaki meritvi upoštevali maksimum absorpcije vsake posamezne učinkovine. Te so bile za natrijev ibuprofenat 264 nm, natrijev naproksenat 332 nm in natrijev salicilat 231 nm. Od izmerjenih absorbanc vzorcev smo vedno odšteli vrednost absorbance slepega vzorca.



Slika 14: Odvzemanje vzorcev z različnimi vsebnostmi posamezne učinkovine v točno določenih časovnih intervalih in njihov prenos na mikrotitrne plošče

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. VREDNOTENJE NANOVLAKEN

Za morfološko analizo nanovlaken smo uporabljali posnetke posameznih vzorcev pridobljenih z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), ki smo jih ovrednotili s programom ImageJ. Naš osnovni namen je bil proučiti ali, in če, kako različne vsebnosti in vrsta dodanih zdravilnih učinkovin vplivajo na povprečni premer nanovlaken PVA, njihova namestitve v notranjost ali na površino nanovlaken ter njihovo sproščanje iz dostavnega sistema.

4.1.1. Vpliv odstotka vgrajene učinkovine na povprečni premer nanovlaken

Slike 15, 16 in 17 prikazujejo povprečne premere nanovlaken izdelanih iz 8 % raztopine PVA brez in z vgrajenimi učinkovinami v različnih odstotkih (1, 5, 10 ter 20 %). Vidimo, da povprečni premer nanovlaken upada s povečanjem odstotka vgrajene učinkovine. Zmanjšanje premera je bilo najbolj razvidno v primeru uporabe natrijevega ibuprofenata, najmanjše pa je bilo po dodatku natrijevega salicilata (Tabela 1). Opazimo tudi, da je bil v primeru uporabe 1 in 5 % dodatka učinkovine povprečni premer nanovlaken najmanjši pri natrijevem ibuprofenatu, sledila pa so nanovlakna z vgrajenim natrijevim salicilatom in nato z natrijevim naproksenatom. S povečano količino vgrajenih učinkovin (10 in 20 %), pa se je vrstni red nekoliko spremenil. Najmanjši povprečni premer so imela nanovlakna z vgrajenim natrijevim ibuprofenatom, sledila so tista, ki so vsebovala natrijev naproksenat in na koncu tista z natrijevim salicilatom.

Tabela 1: Fizikalno-kemijske lastnosti natrijevega ibuprofenata, natrijevega naproksenata in natrijevega salicilata

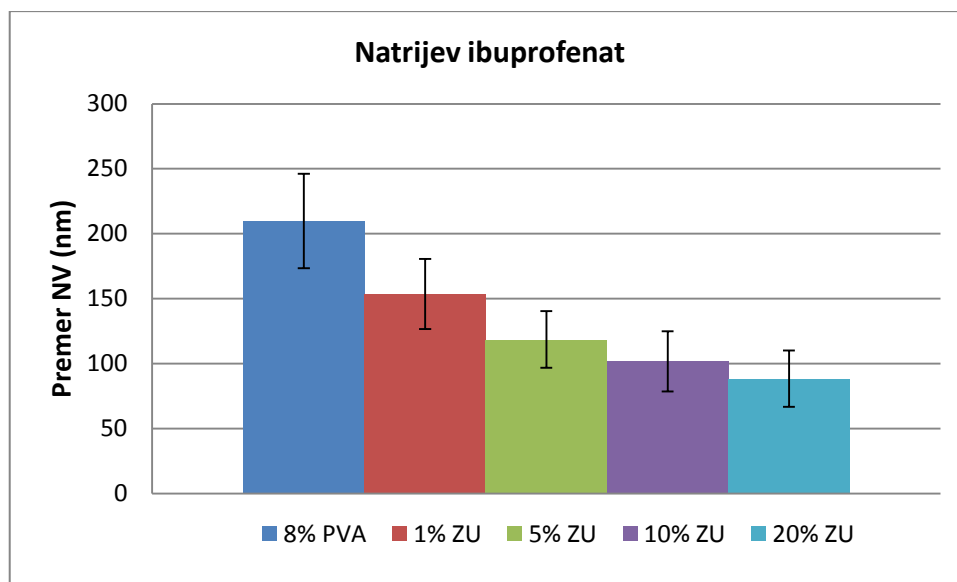
Fiz.-kem. lastnosti	Na-ibuprofenat	Na-naproksenat	Na-salicilat
Kemijska formula	$C_{13}H_{17}NaO_2$	$C_{14}H_{13}NaO_3$	$C_7H_5NaO_3$
Molekulska masa (g/mol)	228,26	252,24	160,1
Temp. tališča (°C)	60,24	153,96	121,82
Log P	3,14	2,86	0,83
Gostota (g/cm ³)	1,03	1,35	0,35
Vodotopnost (mg/ml)	100	250	50
pKa	4,6	4,2	2,9

Večji vpliv natrijevega ibuprofenata na povprečni premer nanovlaken lahko pripišemo strukturi in velikosti njegovega aniona. V našem primeru si velikosti anionov sledijo takole: ibuprofen>naproksen>salicilna kislina. V splošnem velja, da večji kot je anion, težje se giblje v raztopini, to pa se je posledično izrazilo v nekoliko manjši prevodnosti raztopine, kot so jo izmerili v predhodni diplomski nalogi (38).

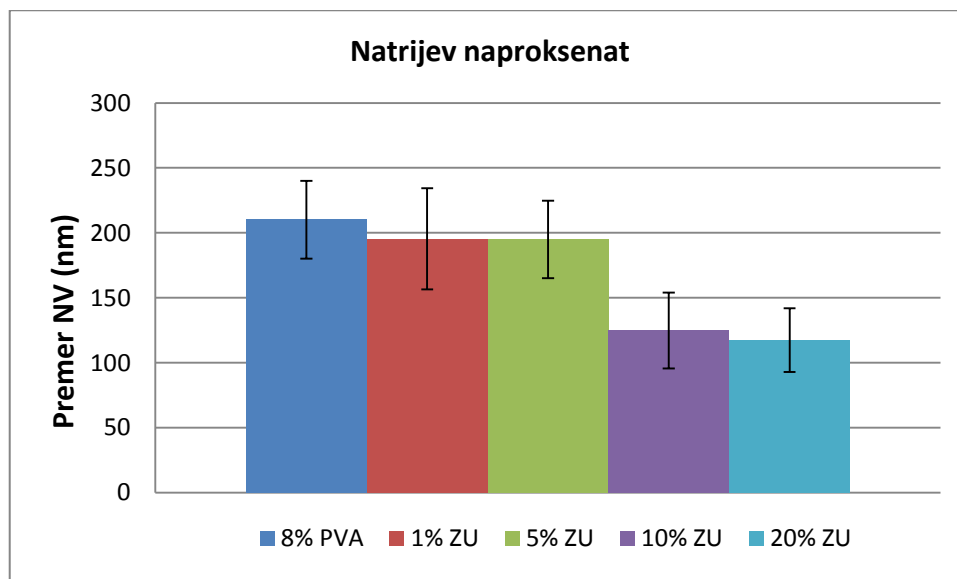
Iz predhodno objavljenih in naših rezultatov lahko torej sklepamo, da se s povečevanjem vsebnosti posamezne soli izbranih NSAID, poveča tudi prevodnost raztopin polimera, in sicer zaradi višjih odbojnih sil v curku. Zato so izdelana nanovlakna tanjša. Torej, višja kot je koncentracija posamezne učinkovine, manjši je povprečni premer nanovlaken. Ta izsledek se ujema z rezultati Charernsirwilaiwata in sodelavcev (17) ter Sona in sodelavcev (30).

Na prevodnost raztopine bistveno vpliva tudi število delcev uporabljene učinkovine, ki pa je sorazmerno koncentraciji ionov v raztopini. S povečevanjem števila delcev v raztopini se posledično viša tudi njena prevodnost. V primeru 1 % raztopine polimera je bila količina vgrajene učinkovine 0,5 g. S pomočjo Avogadrovega števila ($6 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) ter podatkov o molekulskih masah posameznih učinkovin smo izračunali, da pripada največje število ionov natrijevemu salicilatu ($1 \cdot 88 \cdot 10^{21}$), sledi natrijev ibuprofenat ($1 \cdot 32 \cdot 10^{21}$) in nato natrijev naproksenat ($1 \cdot 19 \cdot 10^{21}$). Iz teh podatkov bi lahko sklepali, da bodo nanovlakna z vgrajenim natrijevim salicilatom najtanjša, slediti pa bi jim morala tista z vgrajenim natrijevim ibuprofenatom in natrijevim naproksenatom, vendar pa naši rezultati temu ne ustrezajo. Zato lahko sklepamo, da se v našem primeru število delcev posamezne

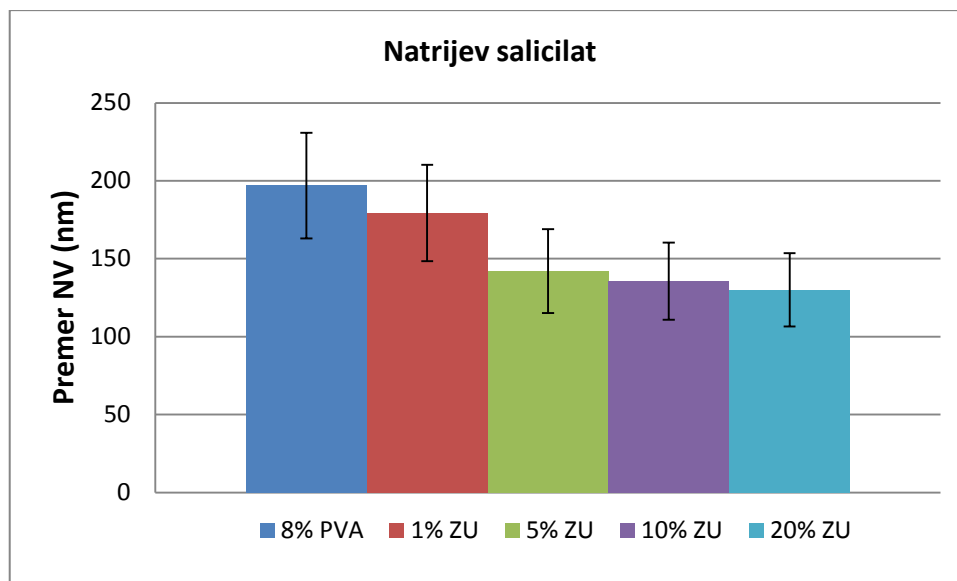
učinkovine ni razlikovalo toliko, da bi to imelo bistven vpliv na povprečni premer izdelanih nanovlaken.



Slika 15: Vpliv količine dodanega natrijevega ibuprofenata na povprečne premere nanovlaken (n=50). Prikazane so tudi vrednosti SD.



Slika 16: Vpliv količine dodanega natrijevega naproksenata na povprečne premere nanovlaken (n=50). Prikazane so tudi vrednosti SD.



Slika 17: Vpliv količine dodanega natrijevega salicilata na povprečne premere nanovlaken (n=50). Prikazane so tudi vrednosti SD.

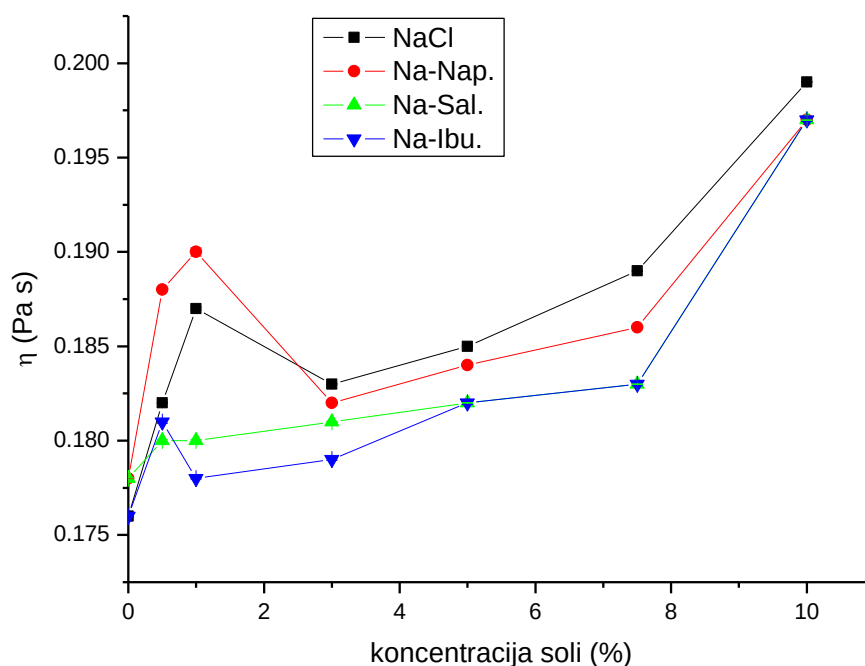
Tabela 2: Vrednosti povprečnih premerov nanovlaken za posamezne odstotke učinkovine, s pripadajočimi SD (n=50)

ZU (%)	Povprečni premer NV (nm)		
	IB	NA	SA
0 (samo PVA)	210 +/- 36	210 +/- 30	197 +/- 34
1	154 +/- 27	195 +/- 39	179 +/- 31
5	119 +/- 22	195 +/- 30	142 +/- 27
10	102 +/- 23	125 +/- 29	136 +/- 25
20	88 +/- 22	117 +/- 24	130 +/- 23

4.1.2. Vpliv vgrajenih učinkovin na morfologijo nanovlaken

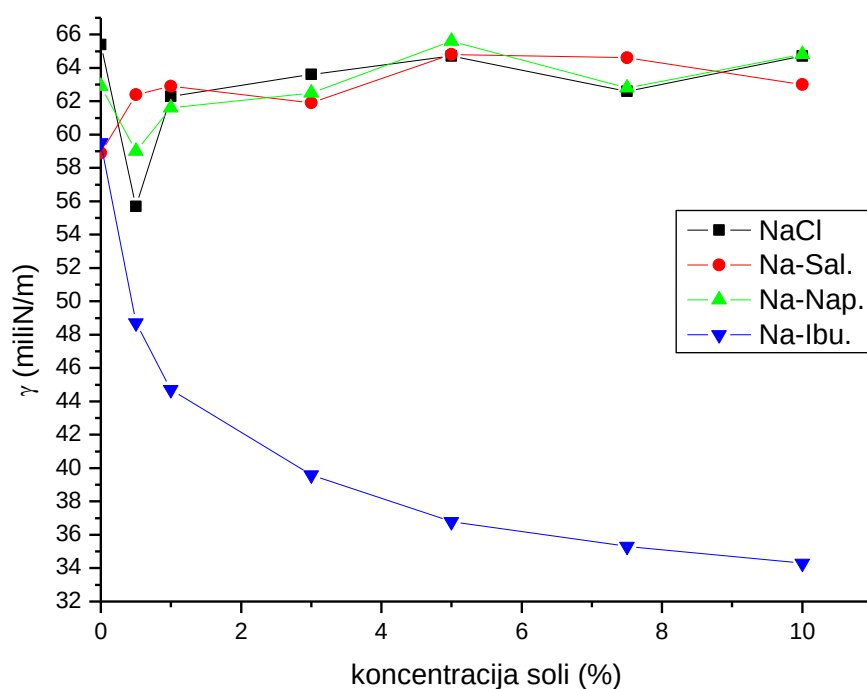
Posnetki SEM nanovlaken izdelanih iz 8 % PVA, v katera smo vgradili preiskovane učinkovine v različnih odstotkih glede na izhodno maso polimera, so prikazani na slikah 20, 21 in 22. Ugotovili smo, da so bila nanovlakna z 1 ali 5 % učinkovine gladka in to ne glede na vrsto uporabljenega NSAID. Prve pojave kristalov na površini nanovlaken, vozlov in kapljic smo zaznali šele pri tistih nanovlaknih, v katerih je bil odstotek učinkovine 10 in več. Sklepamo torej lahko, da z dodajanjem učinkovine že toliko spremenimo fizikalne lastnosti polimernih raztopin, da izbrani procesni pogoji niso več

optimalni. S povečanjem odstotka dodanih učinkovin se namreč viša prevodnost raztopin, poveča pa se tudi njihova viskoznost, kar so dokazali v predhodnih študijah, opravljenih na Fakulteti za farmacijo (38). Tako spremenjene lastnosti polimernih disperzij povzročijo nesorazmernost sil v curku in posledično nastajanje vozlov. Zaradi vplivov na naraščanje viskoznosti bi pričakovali (glej Slika 18), da bo pojavnost vozlov največja v primeru natrijevega naproksenata, vendar pa so naši rezultati pokazali drugače. Največ vozlov smo namreč opazili v vlaknih, ki so vsebovala natrijev ibuprofenat.



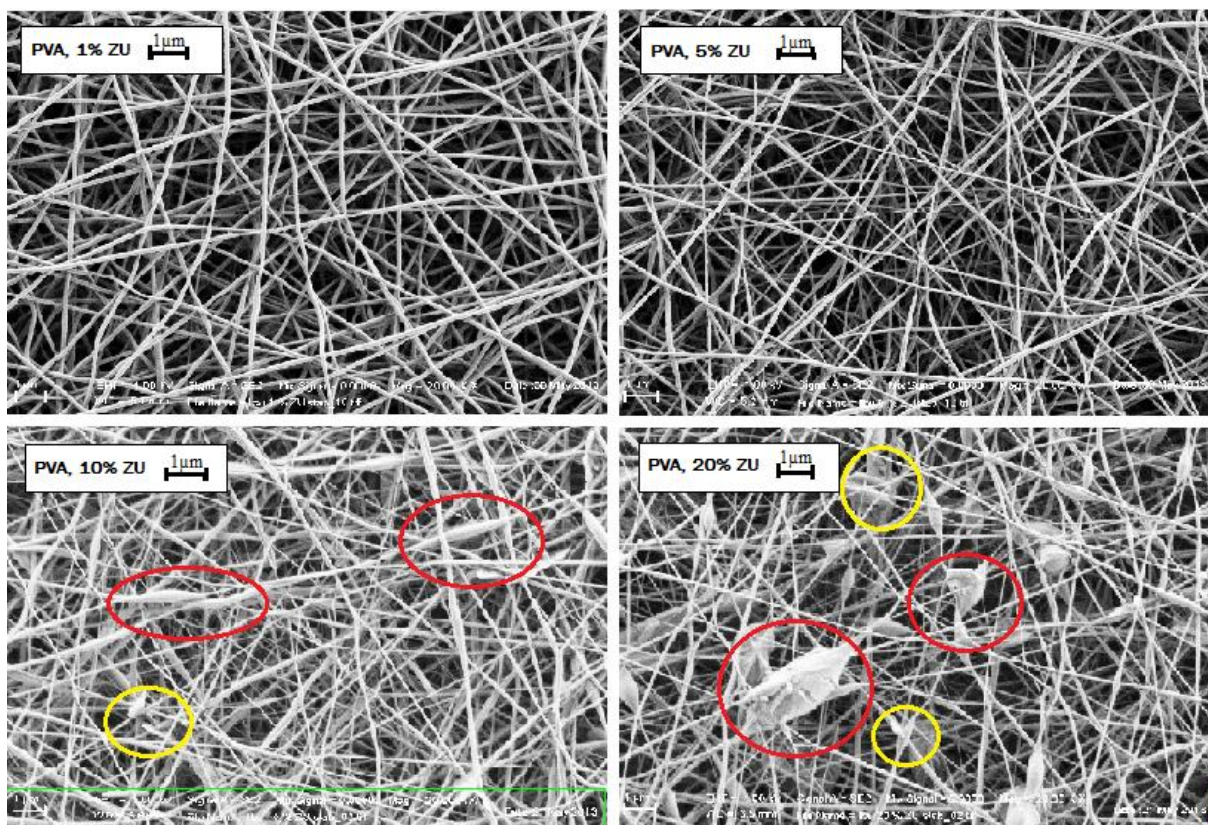
Slika 18: Vpliv različnih količin dodanih natrijevih soli učinkovin na viskoznost 8 % raztopine PVA (38).

Slika 18 prikazuje spremembe viskoznosti 8 % raztopine PVA po dodatku različnih količin natrijevih soli izbranih učinkovin. Vidimo, da že po dodatku 1 % natrijeve soli vseh učinkovin viskoznost v vseh primerih naraste, nato pa njena vrednost pade do 3 % in ponovno narašča s povečanjem odstotka. Ugotovimo lahko tudi, da je največji porast viskoznosti povzročil natrijev naproksenat. Viskoznosti raztopin PVA z dodanim natrijevim salicilatom in natrijevim ibuprofenatom pa so si zelo podobne. (povz. po Zupančič, 2013, str.37) (38).



Slika 19: Vpliv različnih količin dodanih natrijevih soli učinkovin na površinsko napetost 8 % raztopine PVA (38).

Slika 19 prikazuje spremembe vrednosti površinske napetosti 8 % raztopin PVA, ki vsebujejo različne količine natrijevih soli preiskovanih učinkovin. Vidimo, da se s povečevanjem vsebnosti natrijevega naproksenata in natrijevega salicilata površinska napetost 8 % raztopine PVA ne spremeni bistveno. Veliko spremembo površinskih napetosti pa opazimo po dodatku natrijevega ibuprofenata, saj se s povečevanjem njegove vsebnosti, njena vrednost močno zmanjša. Iz tega sklepamo, da dodatek natrijevega naproksenata in natrijevega salicilata v različnih odstotkih nima pomembnega vpliva na površinsko napetost 8 % raztopine PVA. Po drugi strani pa lahko, zaradi izrazitega zmanjšanja površinske napetosti, ki jo povzroči natrijev ibuprofenat, sklepamo, da v raztopini polimera deluje kot površinsko aktivna snov (povz. po Zupančič, 2013, str.37) (38).

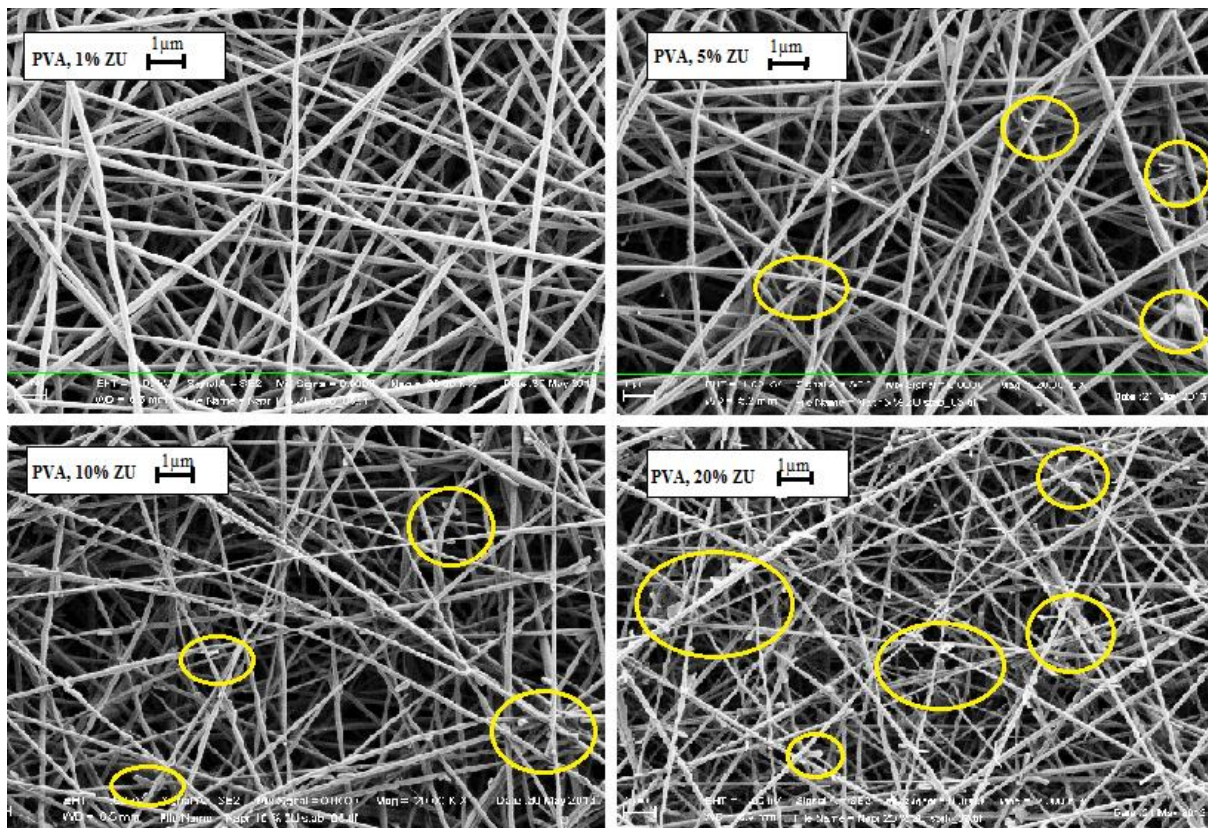


Slika 20: Posnetki SEM nanovlaken z različnimi vsebnostmi natrijevega ibuprofenata pri povečavi 20. 000x. Z rdečimi krogi so obkroženi vozli, z rumenimi pa kristali učinkovine na površini nanovlaken.

Pojav vozlov pri višjih vsebnostih vgrajenih soli učinkovine je lepo viden na Sliki 20, ki prikazuje posnetke SEM nanovlaken z različno vsebnostjo Na ibuprofenata. Pri 1 in 5 % vsebnosti omenjene učinkovine so bila nanovlakna gladka in brez sprememb njihove morfologije. Z njenim povečanjem na 10 oziroma 20 % pa so se pojavili vozli. Opazili smo tudi, da pri višjih odstotkih vgradnja učinkovine v nanovlakna ni bila popolna, saj smo na njihovi površini opazili kristalčke učinkovine.

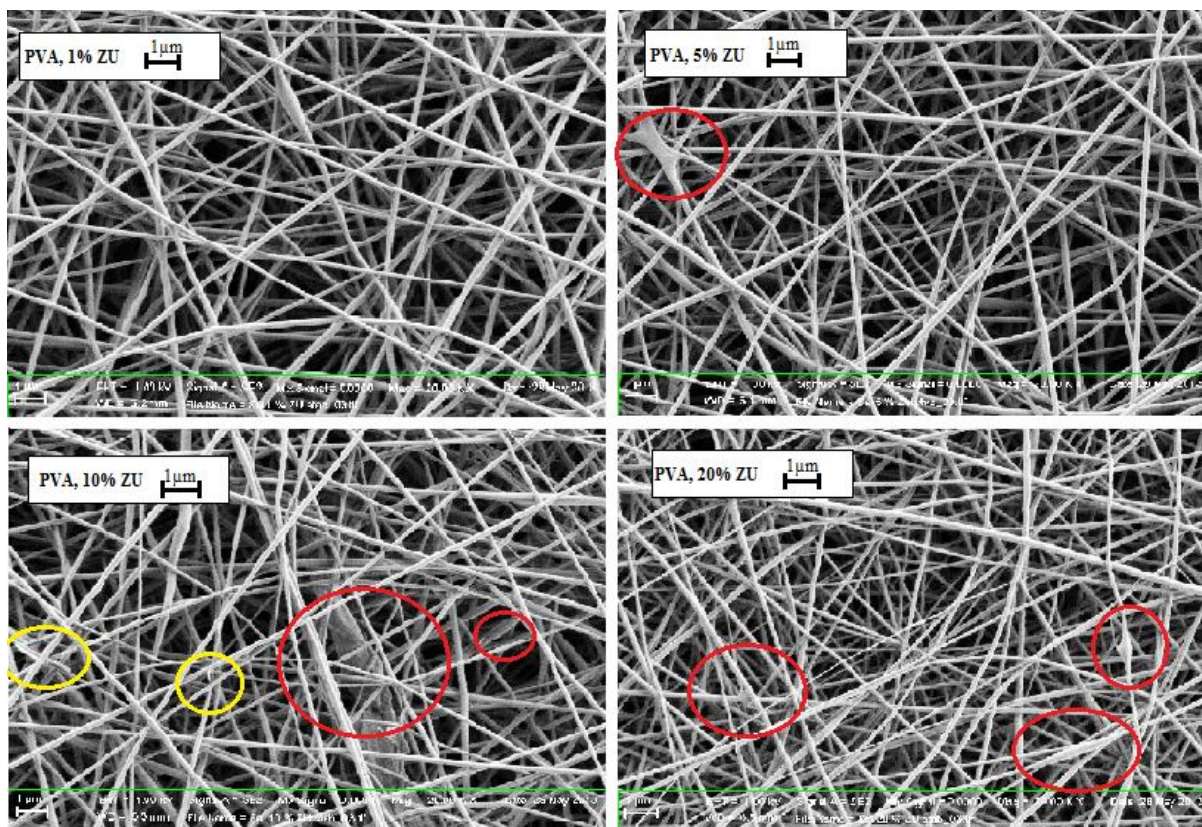
Slika 21 prikazuje posnetke SEM nanovlaken, v katera smo v različnih odstotkih glede na maso polimera vgrajevali natrijev naproksenat. Vidimo, da v tem primeru, kljub povečevanju vsebnosti učinkovine, ni prišlo do tvorbe vozlov. Prav tako lahko vidimo, da se je natrijev naproksenat slabše vgrajeval v nanovlakna, saj smo kristalčke na njihovi površini opazili že pri 5 % vsebnosti učinkovine. Še več, na osnovi vseh posnetkov SEM smo zaključili, da se je med vsemi učinkovinami najmanj natrijevega naproksenata

vgradilo v nanovlakna saj smo ga največ opazili na njihovi površini. Povečanje odstotka soli namreč vpliva na višanje prevodnosti polimerne



Slika 21: Posnetki SEM nanovlaken z različnimi vsebnostmi natrijevega naproksenata pri povečavi 20. 000x. Z rdečimi krogi so obkroženi vozli, z rumenimi pa kristali učinkovine na površini nanovlaken.

raztopine to pa v procesu elektrostatskega sukanja vodi v tvorbo tanjših nanovlaken. Tako lahko sklepamo, da v procesu elektrostatskega sukanja pride do raztegovanja verig polimera kar pomeni, da je na enakem odseku polimera na razpolago manj mest za vezavo učinkovine. Zato je ostane več nevezane, zaradi česar se pojavi v obliki kristalčkov na površini nanovlaken.



Slika 22: Posnetki SEM nanovlaken z različnimi vsebnostmi natrijevega salicilata pri povečavi 20. 000x. Z rdečimi krogi so obkroženi vozli, z rumenimi pa kristali učinkovine na površini nanovlaken.

Slika 22 prikazuje posnetke SEM nanovlaken, v katera smo vgrajevali različne odstotke natrijevega salicilata glede na maso polimera. Vidimo, da so vozli manj izraziti, kot v primeru natrijevega ibuprofena. Vozli so se pojavili v majhnem številu in sicer od 5 % vsebnosti učinkovine dalje. Na sliki nanovlaken z vsebnostjo 10 % natrijevega salicilata, opazimo majhne kristalčke učinkovine na površini vlaken, ki pa jih je zelo malo.

Z analizo in primerjavo vseh rezultatov smo ugotovili, da se je največ kristalčkov na površini nanovlaken pojavilo pri uporabi natrijevega naproksenata, temu je sledil natrijev ibuprofenat in nato natrijev salicilat. Zato lahko sklepamo, da ima pomemben vpliv na vgradnjo učinkovine v nanovlakna njihova molekulska masa in velikost molekul. V našem primeru ima natrijev naproksenat največjo molekulsko maso ($M_r=252,24$ g/mol), sledi mu natrijev ibuprofenat ($M_r=228,26$ g/mol) in nato natrijev salicilat ($M_r=160,10$ g/mol). Menimo, da je za vgrajevanje učinkovin v nanovlakna bolje uporabiti take z nižjo

molekulska masa in z manjšo velikostjo molekul, saj je tako možnost pojava kristalov manjša.

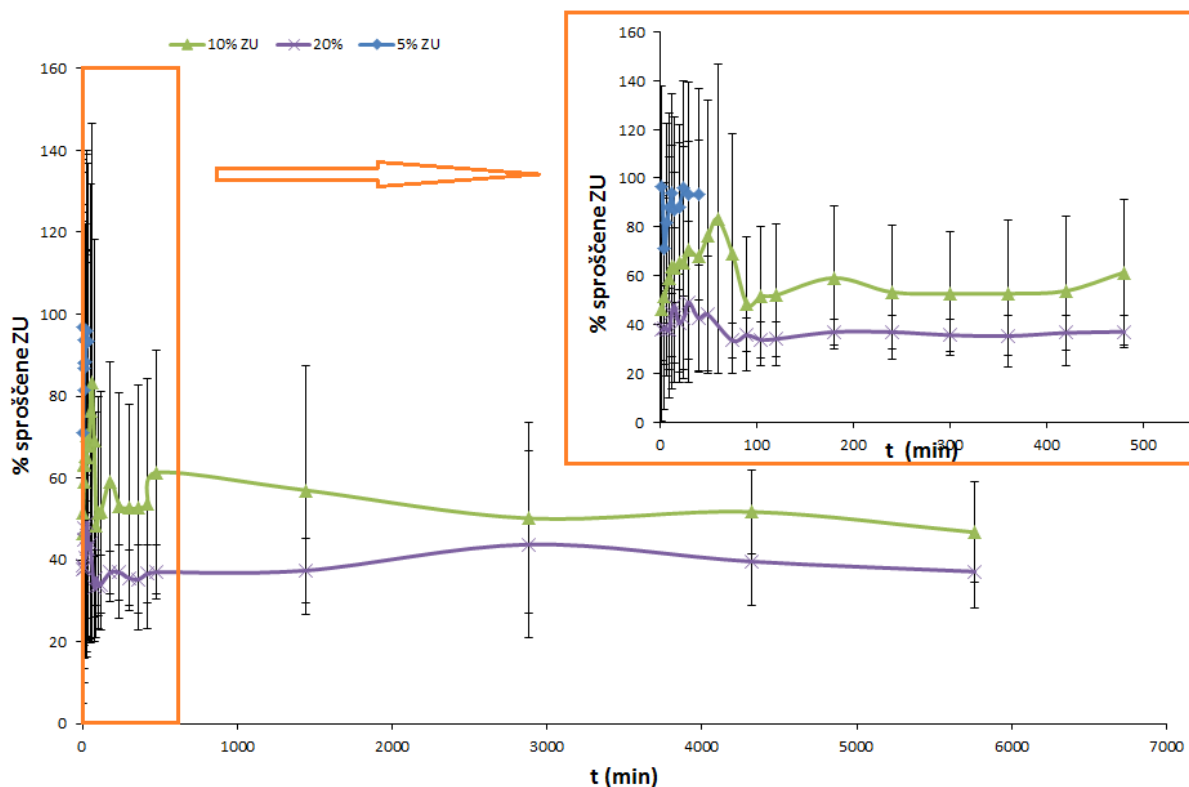
4.2. SPROŠČANJE NATRIJEVEGA IBUPROFENATA

Natrijev ibuprofenat smo vgrajevali v nanovlakna v različnih odstotkih, in sicer 1, 5, 10 ter 20 % (m/m) glede na maso polimera (8 % PVA). Ugotovili smo, da se ne glede na vsebnost vgrajene učinkovine, ta v celoti sprosti takoj po dodatku pufra. Učinkovina je torej uporabna za vgrajevanje v obloge za rane iz PVA le, kadar želimo doseči hiter učinek, za podaljšano delovanje pa bi morali uporabiti drug polimer ali sam ibuprofen. Za potrditev te predpostavke bi bilo potrebno dodatno raziskovanje.

4.3. SPROŠČANJE NATRIJEVEGA NAPROKSENATA

Slika 23 prikazuje profil sproščanja natrijevega naproksenata iz nanovlaken v obdobju 5 dni (večji graf) ter v začetnih 8 urah (manjši graf) po uporabi fosfatnega pufra. Iz slike je razvidno, da s povečanjem odstotka vgrajene učinkovine, njen % sproščanja upada. V primeru 5 % vgrajene učinkovine je delež sproščene učinkovine presegel 100 % že po prvi uri meritev.

Kot so ugotovili že Jannesari in sod., smo tudi mi dokazali, da se s povečanjem količine vgrajene učinkovine, njen delež sproščene zmanjšuje (39), kar pripisujemo stopnji nabrekanja nanovlaken. S povečevanjem koncentracije učinkovine pufer najverjetneje v nanovlakna prodira počasneje, zato ta manj nabrekajo, učinkovina pa se iz njih sprošča počasneje.



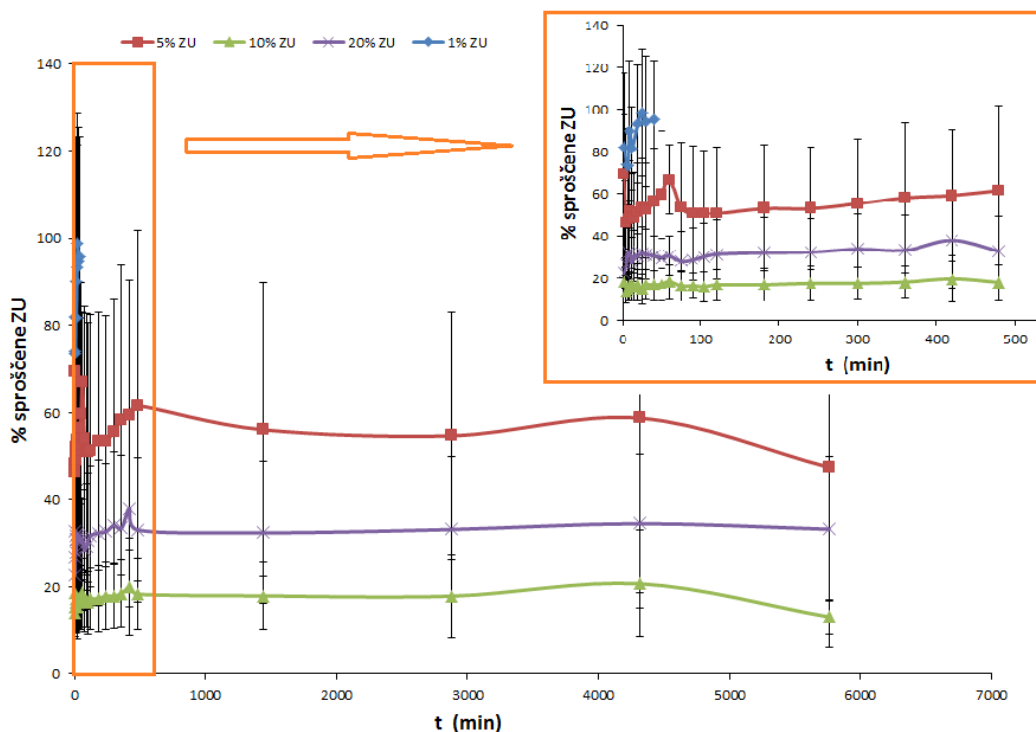
Slika 23: Sproščanje natrijevega naproksenata iz stabiliziranih nanovlaken, izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD za vsako meritev.

Na sliki 23 vidimo tudi, kako % sproščene učinkovine niha brez določenega trenda pri najnižji vsebnosti učinkovine, torej pri 5 %, medtem ko je pri višjih vsebnostih (10 in 20 %) ta delež razporejen bolj enakomerno. Manjši graf kaže, da se je v primeru 10 % vsebnosti natrijevega naproksenata v prvih 8 urah sprostito do 61 % učinkovine, medtem ko je bil ta delež po 5 dneh 46 %. V primeru 20 % vsebnosti učinkovine, se je v prvih 8 urah iz nanovlaken sprostito le 37 % učinkovine, ta delež pa se je obdržal tudi po 5 dneh sproščanja.

4.4. SPROŠČANJE NATRIJEVEGA SALICILATA

Slika 24 prikazuje profil sproščanja natrijevega salicilata iz nanovlaken v obdobju 5 dni (večji graf) ter v začetnih 8 urah (manjši graf). Prav tako kot v prejšnjem primeru lepo vidimo kako s povečanjem vsebnosti vgrajene učinkovine, njen sproščeni delež upada. Le

v primeru 1 % vsebnosti učinkovine je njen sproščeni delež že po 60 minutah presegel 100 %. To lahko pripišemo, nizki koncentraciji učinkovine in posledično možni napaki pri detekciji.



Slika 24: Sproščanje natrijevega salicilata iz stabiliziranih nanovlaken izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD za vsako meritev.

Slika 24 prikazuje hiter začetni porast sproščene natrijevega salicilata iz nanovlaken z vgrajenim 1 % učinkovine, medtem ko se je v primeru 5, 10 in 20 % vsebnost učinkovine sproščala brez začetnega dviga, nato pa precej enakomerno. Iz nanovlaken z 5 % natrijevega salicilata, se je v prvih 8 urah sprostilo 61 % učinkovine, po 5 dneh pa je ta delež znašal le še 47 %. V primeru nanovlaken z vgrajenimi 10 % učinkovine pa je bil delež sproščene učinkovine po 8 urah le 18 %, po 5 dneh pa je upadel na 13 %.

Rezultati sproščanja 20 % v nanovlakna vgrajene učinkovine pa so bili nekoliko višji, saj se je v prvih 8 urah sprostilo 33 % natrijevega salicilata, ta delež pa je ostal enak tudi po 5 dneh. Na osnovi naših rezultatov lahko sklepamo, da so imela najboljše profil sproščanja tista nanovlakna, ki so vsebovala višje % vgrajene učinkovine, saj je bil v tem primeru ta najbolj enakomeren, brez nihanj in nenadnih porastov. Najslabše rezultate sproščanja pa

smo ugotovili pri nanovlaknih z nižjimi koncentracijami učinkovine, saj je v vseh primerih % sproščene učinkovine dosegel skoraj 100 % že kmalu po začetku izvajanja meritev.

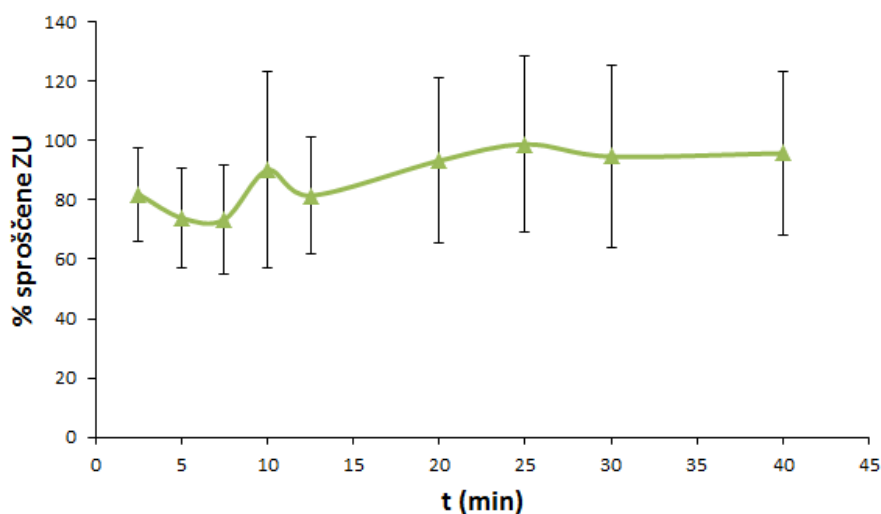
4.5. PRIMERJAVA SPROŠČANJA VSEH UČINKOVIN

4.5.1. Sproščanje 1% vsebnosti učinkovin

Slika 25 prikazuje profil sproščanja natrijevega salicilata z vsebnostjo 1 % (m/m), in sicer v obdobju 45 min od začetka opravljanja meritev. Tako natrijev ibuprofenat kot naproksenat sta se iz nanovlaken v celoti sprostila takoj po dodatku pufra, zato so bile vrednosti prve meritve 100 %.

Taepaiboon in sod. so poleg ugotavljanja profilov sproščanja 4 različnih učinkovin, preučevali tudi njihov vpliv na morfologijo nanovlaken iz PVA. Med preiskovanimi učinkovinami sta bili tudi natrijev naproksenat in natrijev salicilat. Ugotovili so, da ima molekulska masa posamezne učinkovine velik vpliv na njeno sproščanje, saj je bilo v primeru njenih višjih vrednosti sproščanje manjše (40).

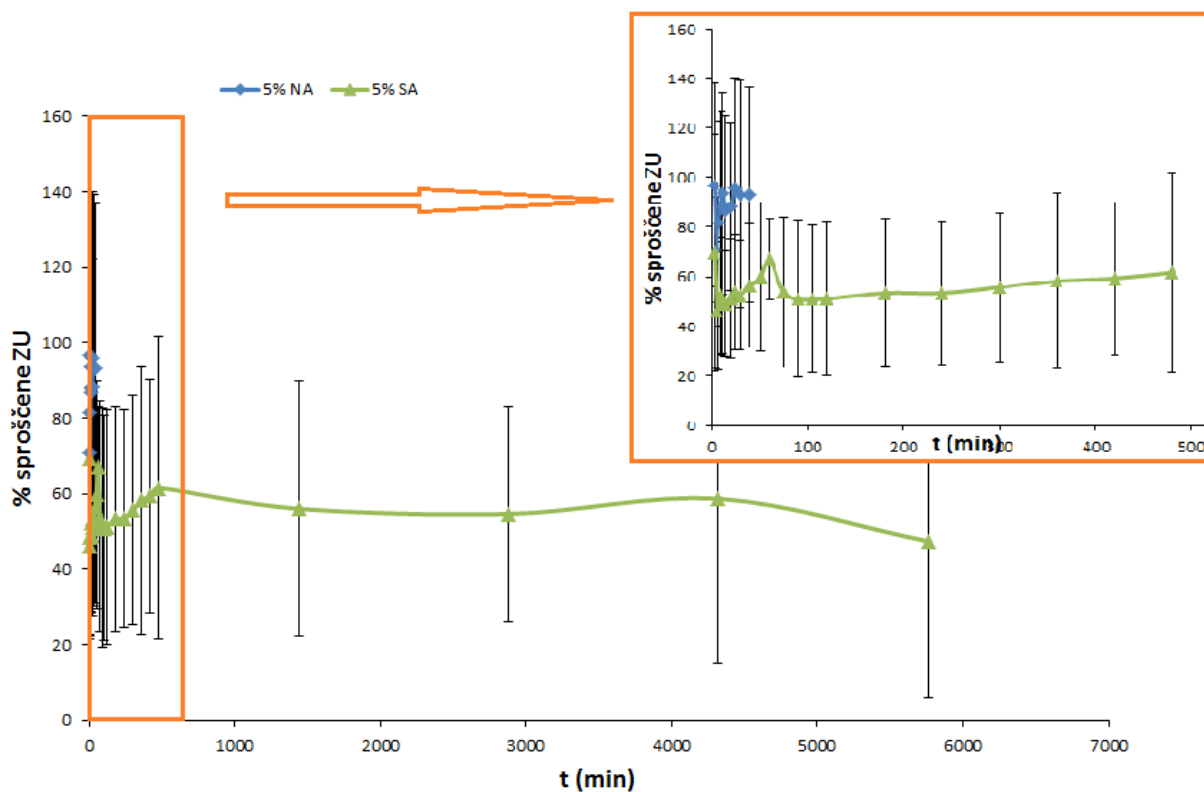
Na podlagi tega bi lahko sklepali, da se bo natrijev naproksenat počasneje sproščal, sledil naj bi mu natrijev ibuprofenat in nato še natrijev salicilat, ki ima najnižjo molekulsko maso. Vendar pa v našem primeru ni bilo tako. Na sliki 25 vidimo da je bil natrijev salicilat edini med preizkušenimi učinkovinami, ki se ni sprostil v celoti takoj po dodatku pufra. Ker je delež sproščenega natrijevega ibuprofenata že od vsega začetka močno variiral (100 % sproščene učinkovine), bi lahko sklepali, da se ni pravilno vgradil v nanovlakna, poleg tega bi na naše rezultate lahko vplivale tudi zelo nizke koncentracije učinkovine v vzorcih. Kot vidimo tudi na posnetkih SEM, se je natrijev ibuprofenat dejansko najslabše vgrajeval v nanovlakna, saj so ta vsebovala polno vozlov in so bila neenakomernih velikosti. Zaradi tega ga je bilo veliko tudi na površini nanovlaken, zaradi česar se je takoj po stiku s pufrom raztopil.



Slika 25: Sproščanje 1% natrijevega salicilata iz stabiliziranih nanovlaken, izdelanih iz PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD za vsako meritev.

4.5.2. Sproščanje 5 % vsebnosti učinkovin

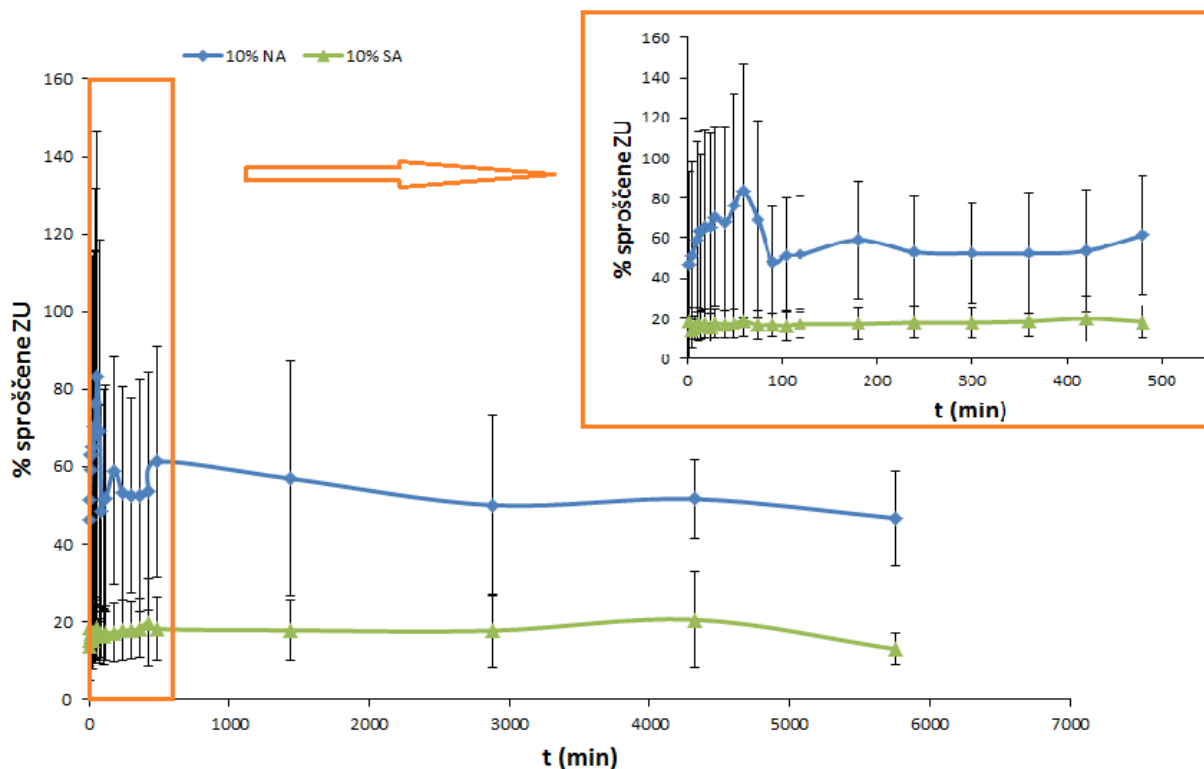
Slika 26 prikazuje profile sproščanja natrijevega naproksenata in natrijevega salicilata z vsebnostjo 5 % (m/m) učinkovine v nanovlaknih, in sicer tako v obdobju 5 dni kot znotraj začetnih 8 ur. Tako kot v primeru 1 % vsebnosti učinkovine, na sliki ni prikazanih podatkov za natrijev ibuprofenat, saj se je le ta v celoti (100 %) sprostil iz nanovlaken takoj po aplikaciji pufra. Sledil mu je natrijev naproksenat, katerega sproščeni delež je dosegel 100 % že v začetnih 60 minutah opravljanja meritev. V tem smislu je bil zadnji natrijev salicilat, saj njegovi deleži znotraj profila sproščanja niso presegali 100 %, kar je zelo sprejemljivo. V prvih 8 urah se je iz nanovlaken sprostilo le 61 % natrijevega salicilata, po 5 dneh pa je bil njegov sproščeni delež 47 %. V primeru natrijevega naproksenata in salicilata na začetku meritev nismo ugotovili naglega porasta, njihovo sproščanje pa je bilo konstantno skozi celotno obdobje meritev.



Slika 26: Sproščanje 5 % natrijevega salicilata in naproksenata iz stabiliziranih nanovlaknen, izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD za posamezne meritve.

4.5.3. Sproščanje 10 % vsebnosti učinkovin

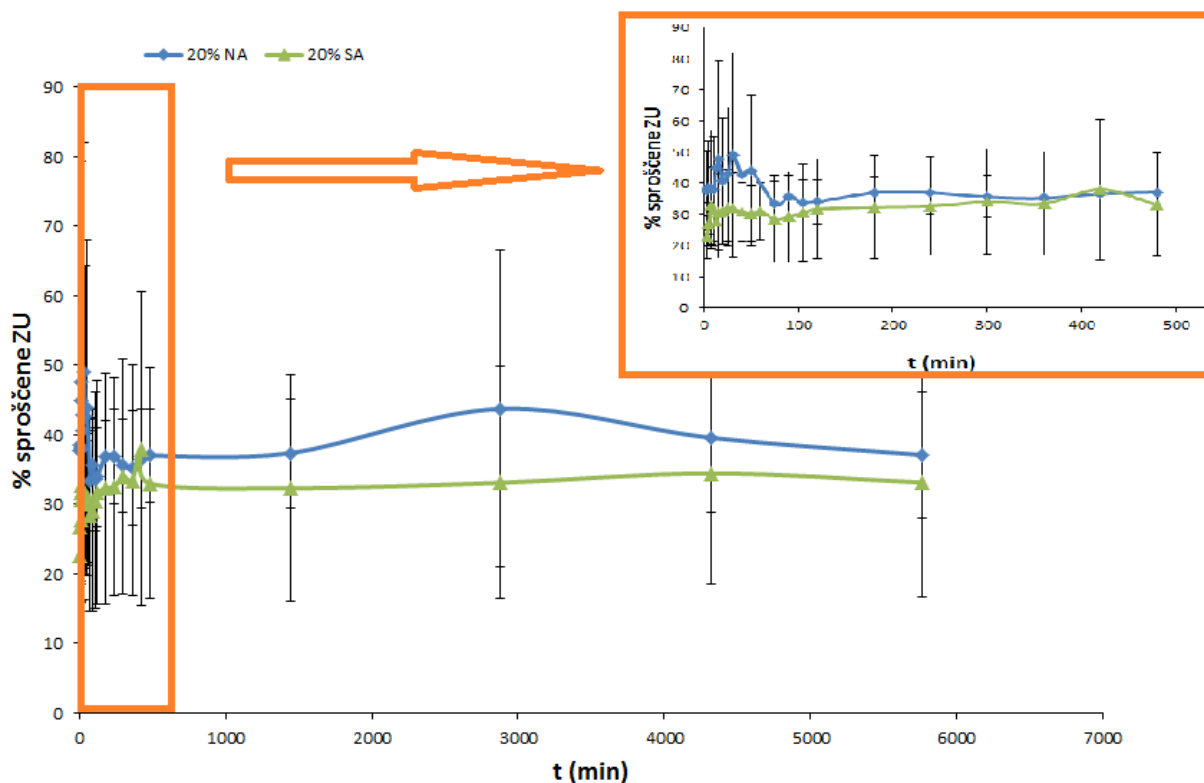
Na sliki 27 so prikazani profili sproščanja natrijevega naproksenata in salicilata, vgrajenih v nanovlakna z vsebnostjo 10 % (m/m), glede na maso polimera. Sproščeni deleži natrijevega ibuprofenata presegajo 100 %, kar ni sprejemljivo. Pri tej koncentraciji vgrajenega natrijevega naproksenata pa sproščeni deleži niso presegali 100 % kot je bilo to pri nižjih koncentracijah. Pri tem pa so bili zopet višji od odstotkov sproščenega natrijevega salicilata. V prvih 8 urah se je sprostil največ natrijevega naproksenata (61 %) in natrijevega salicilata (18 %). Po 5 dneh pa so vrednosti nekoliko padle in sicer v primeru natrijevega naproksenata na 46 %, v primeru natrijevega salicilata pa na 13 %. Natrijev naproksenat in natrijev salicilat sta se tudi tokrat sproščala enakomerno in konstantno, brez večjih odstopanj.



Slika 27: Sproščanje 10 % natrijevega salicilata in naproksenata iz stabiliziranih nanovlaken, izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednosti SD za posamezne meritve.

4.5.4. Sproščanje 20 % vsebnosti učinkovin

Slika 28 prikazuje profil sproščanja natrijevega naproksenata in salicilata iz nanovlaken, v katera smo jih vgradili z vsebnostjo učinkovine 20 % (m/m). Vidimo, da natrijev ibuprofenat ponovno presega 100 % vrednosti sproščenega deleža takoj po dodatku pufra, zato so ti podatki neuporabni. Nasprotno pa deleži sproščenih natrijevega naproksenata in salicilata niso dosegli niti 50 %. Ponovno lahko opazimo večji delež sproščanja pri natrijevem naproksenatu, ki mu, tako kot že v prejšnjih primerih sledi natrijev salicilat, se pa krivulji sproščenih količin obeh učinkovin zelo približata ena drugi. V prvih 8 urah se je iz nanovlaken sprostilo 37 % natrijevega naproksenata in 33 % natrijevega salicilata. Po 5 dneh pa so bili njihovi sproščeni deleži enaki kot po 8 urah, kar pomeni, da ni bilo nihanja kot pri nižjih koncentracijah.



Slika 28: Sproščanje 20 % natrijevega salicilata in naproksenata iz stabiliziranih nanovlaken, izdelanih iz 8 % PVA. Prikazane so tudi vrednost SD za posamezne meritve.

Tudi v tem primeru je sproščanje natrijevega naproksenata in natrijevega salicilata enakomerno in konstantno skozi celotno obdobje meritev. Rahel dvig v deležu sproščene učinkovine je mogoče opaziti pri obeh učinkovinah v prvih 8 meritvah, nato pa so se vrednosti stabilizirale ali celo nekoliko upadle.

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko trdimo, da sta za izdelavo oblog za rane najprimernejša natrijev naproksenat in predvsem natrijev salicilat, saj se je ta najbolj vgrajeval v nanovlakna. Najneprimernejši za ta namen je bil natrijev ibuprofenat, ki se je najslabše vgrajeval v nanovlakna. Njegovo sproščanje je bilo namreč praktično popolno že takoj ob stiku z pufrom. Tako natrijev naproksenat kot salicilat bi torej lahko uporabili za vgrajevanje v obloge za rane, vendar pa bi morali prvega uporabiti v višjih odstotkih vsebnosti učinkovine, drugega pa lahko tudi v nižjih.

5. SKLEP

V našem delu smo preučevali nanovlakna iz 8 % PVA, izdelana z metodo elektrostatskega sukanja, v katera smo vgradili štiri različne količine učinkovin NSAID, natrijeve soli ibuprofena, naproksena in salicilne kisline, in sicer z 1, 5, 10 ter 20 % (m/m) vsebnostjo učinkovine. Osredotočili smo se na ugotavljanje vplivov dodanih učinkovin in zvišanje njihovih koncentracij, na povprečne premere nanovlaken in njihovo morfologijo. Poleg tega pa smo vrednotili tudi njihovo sproščanje iz nanovlaken.

Ugotovili smo, da se s povečanjem koncentracij dodanih učinkovin, povprečni premeri nanovlaken zmanjšujejo. To lahko pripišemo sočasnemu povečanju prevodnosti posameznih raztopin polimera, posledičnemu povečanju odbojnih sil v curku in zaradi tega tudi tvorbi tanjših nanovlaken. Ugotovili smo, da so bila najtanjša tista nanovlakna, v katera smo vgradili natrijev ibuprofenat, sledila so jim tista z natrijevim naproksenatom in nato tista z natrijevim salicilatam, in sicer v vsakem primeru ob uporabi nižjih koncentracij. Kadar pa je bila vsebnost učinkovin večja od 10 %, je bil vrstni red glede povprečnih premerov nanovlaken drugačen: natrijev ibuprofenat je povzročil nastanek najtanjših nanovlaken, sledil je natrijev salicilat in nato še natrijev naproksenat.

S pomočjo posnetkov SEM smo ugotovili, da so bila nanovlakna, ki so vsebovala nižje količine zdravilnih učinkovin (do 5 %) gladka, prvi vozli pa so se pojavili pri višjih koncentracijah (več kot 10 %), kar bi lahko pripisali nesorazmernosti sil v curku, ki je posledica večje koncentracije in zato večje prevodnosti raztopine polimera. Z dodatkom učinkovine namreč že toliko spremenimo fizikalno-kemijske lastnosti polimernih raztopin, da pride do motene tvorbe nanovlaken oziroma do nastanka vozlov. Prav tako smo ugotovili, da je bila pri višjih odstotkih učinkovine njihova vgradnja slabša, saj smo na posnetkih SEM opazili kristalčke učinkovine na površini vlaken. Največ kristalčkov se je pojavilo v primeru natrijevega naproksenata, nekaj smo jih opazili v primeru natrijevega ibuprofenata, najmanj pa jih je bilo na površini vlaken, ki so vsebovala natrijev salicilat. Nižja kot je bila molekulska masa uporabljene učinkovine, bolj se je ta vgrajevala v nanovlakna (manj vozlov in kristalčkov na površini vlaken).

Iz profilov sproščanja posameznih učinkovin smo ugotovili, da se s povečanjem njihove vsebnosti, odstotek sproščanja zmanjšuje. Preučevali smo tudi profile sproščanja vseh treh učinkovin pri posameznih koncentracijah in ugotovili, da je bil delež sproščenega natrijevega ibuprofenata najvišji, saj se je ves sprostil takoj po dodatku pufru, in sicer ne

glede na njegovo količino, ki smo jo vgradili v nanovlakna. V primeru natrijevega salicilata in natrijevega naproksenata se je pri nižjih odstotkih vgrajene učinkovine (do 5 %), sprostila njuna celotna količina že takoj ob dodatku pufra. Pri višjih vgrajenih količinah, torej nad 10 %, pa je bilo njuno sproščanje iz nanovlaken konstantno, brez večjih nihanj skozi celotno obdobje meritev. Deleži sproščene učinkovine so bili v primeru natrijevega naproksenata večji kot pri natrijevem salicilatu. Za natrijev ibuprofenat pa velja, da je bila učinkovitost vgradnje v nanovlakna nizka.

Ugotovili smo, da sta za izdelovanje oblog za rane iz nanovlaken najprimernejša natrijev naproksenat in natrijev salicilat, saj sta se najlepše vgrajevala in sproščala iz nanovlaken. Natrijev naproksenat bi lahko uporabljali v višjih koncentracijah, in sicer 10 in 20 % (m/m), natrijev salicilat pa tudi v nižjih, že od 5 % (m/m) dalje.

6. LITERATURA

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanotechnology#Implications>, 16.06.2013.
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Richard_Feynman, 16.06.2013.
3. http://en.wikipedia.org/wiki/There%27s_Plenty_of_Room_at_the_Bottom, 16.06.2013.
4. Emerich D.F., Thans C.G.: The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. *Biomolecular Engineering* 2006; 23: 171-184.
5. <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>, 15.06.2013.
6. http://en.wikipedia.org/wiki/Norio_Taniguchi, 15.06.2013.
7. <http://student.pfmb.uni-mb.si/~mkropej/fizika/Zgodovina.html>, 15.06.2013.
8. <http://besedomanija.blogspot.com/2007/05/nanotehnologija-2-razvoj.html>, 15.06.2013.
9. Boisseau P., Loubaton B.: Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *C. R. Physique* 2011; 12: 620-636.
10. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Nanomedicina>, 16.06.2013.
11. Etheridge M.L., Campbell S.A., Erdman A.G., Haynes C.L., Wolf S.M., McCullough J.: The big picture of nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: NBM* 2013; 9:1-14.
12. Kristl J.: Implication of nanotechnology on development of medicines. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 67-73.
13. Sill T.J., von Recum H.A.: Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 1989-2006.
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: 417-425.
15. Bhardwaj N., Kundu S.C.: Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 325-347.
16. Maretschek S., Greiner A., Kissel T.: Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins. *Journal of Controlled Release* 2008; 127: 180-187.
17. Charernsirwilaiwat N., Opanasopit P., Rojanarata T., Ngawhrunpat T., Supaphol P.: Preparation and characterization of chitosan-hydroxybenzotriazole/polyvinyl alcohol blend nanofibers by the electrospinning technique. *Carbohydrate Polymers* 2010; 81: 675-680.

18. Tiwari S.K., Venkatraman S.S.: Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers. *Materials Science and Engineering C* 2012; 32: 1037-1042.
19. Tao J., Shivkumar S.: Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA. *Materials Letters* 2007; 61: 2325-2328.
20. Kocbek P.: Novelties in the field of pharmaceutical nanotechnology. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 75-81.
21. Singh R., Lillard Jr. J.W.: Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology* 2009; 86: 215-223.
22. Bogunia-Kubik K., Sugisaka M.: From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. *BioSystems* 2002; 65: 123-138.
23. Parač Z., Triller C., Smrke D.: Sodobni pristopi zdravljenja okužb kirurške in kronične rane. 3. Mariborski kongres družinske medicine: 75-80.
24. Tamayol A., Akbari M., Annabi N., Paul A., Khademhosseini A., Juncker D.: Fiber-based tissue engineering: Progress, challenges, and opportunities. *Biotechnology Advances* 2013; 31: 669-687.
25. Sokolovsky-Papkov M., Agashi K., Olaye A., Shakesheff K., Domb A. J.: Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 187-206.
26. Zhao C., Tan A., Pastorin G., Ho H. K.: Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnology Advances* 2013; 31: 654-668.
27. Shalumon K. T., Anulekha K. H., Nair S. V., Chennazhi K. P., Jayakumar R.: Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011; 49: 247-254.
28. Kim H. N., Hong Y., Kim M. S., Kim S. M., Suh K-Y.: Effect of orientation and density of nanotopography in dermal wound healing. *Biomaterials* 2012; 33: 8782-8792.
29. Biondi M., Ungaro F., Quaglia F., Netti P. A.: Controlled drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 229-242.
30. Son W.K., Youk J.H., Lee T.S., Park W.H.: Effect of pH on electrospinning of poly(vinyl alcohol). *Materials Letters* 2005; 59: 1571-1575.
31. Yang D., Li Y., Nie J.: Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs. *Carbohydrate Polymers* 2007; 69: 538-543.
32. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ibuprofen>, 14.08.2013.

33. Lamprecht A., Saumet J-L., Roux J., Benoit J-P.: Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *International Journal of Nanomedicine* 2004; 278: 407-414.
34. Galindo-Rodriguez S.A., Puel F., Briançon S., Allemann E., Doelker E., Fessi H.: Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 25: 357-367.
35. http://sl.wikipedia.org/wiki/Salicilna_kislina, 14.08.2013.
36. <http://bs.wikipedia.org/wiki/Naproksen>, 14.08.2013.
37. Javadzadeh Y., Ahadi F., Davaran S., Mohammadi G., Sabzevari A., Adibkia K.: Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010; 81: 498-502.
38. Zupančič A.: Vpliv različnih dodanih soli na fizikalno-kemijske lastnosti raztopin polivinilalkohola. Ljubljana 2013.
39. 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. *International Journal of Nanomedicine* 2011; 6: 993-1003.
40. Taepaiboon P., Rungsardthong U., Supaphol P.: Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibers and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology* 2006; 17: 2317-2329.

