Toplinska analiza biokompatibilnih materijala za primjenu u tkivnom inženjerstvu

Vuković, Anamarija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Metallurgy / Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:115:752253

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU METALURŠKI FAKULTET
UNIVERSITY OF ZAGREB FACULTY OF METALLURGY
SISAK

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Metallurgy University of Zagreb - Repository of Faculty of Metallurgy University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
METALURŠKI FAKULTET

Anamarija Vuković

ZAVRŠNI RAD

Sisak, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
METALURŠKI FAKULTET

Anamarija Vuković

TOPLINSKA ANALIZA BIOKOMPATIBILNIH MATERIJALA ZA PRIMJENU U TKIVNOM INŽENJERSTVU

ZAVRŠNI RAD

Voditeljica: Izv.prof.dr.sc. Tamara Holjevac Grgurić

Članovi Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

Izv.prof.dr.sc Ivan Brnardić, Sveučilište u Zagrebu Metalurški fakultet – predsjednik

Izv.prof.dr.sc. Tamara Holjevac Grgurić, Sveučilište u Zagrebu Metalurški fakultet – član

Prof.dr.sc. Stjepan Kožuh, Sveučilište u Zagrebu Metalurški fakultet – član

Doc.dr.sc. Martina Lovrenić-Jugović, Sveučilište u Zagrebu Metalurški fakultet - zamjenski član

Zahvaljujem svojoj voditeljici Izv.prof.dr.sc. Tamari Holjevac Grgurić na uloženom vremenu, savjetima, pomoći i strpljenju. Zahvaljujem se svim nastavnicima Fakulteta na suradnji i stečenom znanju. Posebno zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i dečku koji su bili cijelo vrijeme uz mene i najveća podrška. Također zahvaljujem Prof.dr.sc. Emi Govorčin Bajsić sa Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, kao i Prof.dr.sc. Budimiru Mijović i Dr.sc. Emiliji Zdravevi sa Tekstilno-tehnološkog fakulteta, na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Završni rad izrađen je u okviru istraživačkog projekta „*Ciljana izrada prototipa vlaknastog nosača za uzgoj tkivnih stanica kombiniranim elektroispredanjem - COMBOELECTROSPUN*“, *IP-2016-06-6878,* financiranim od Hrvatske zaklade za znanost.

SAŽETAK:

Tkivno inženjerstvo pruža velike mogućnosti u razvoju umjetnih organa, osobito bioloških regenerativnih materijala, kao što su hrskavica, kosti i koža. Dizajniranje odgovarajućih biorazgradljivih i biokompatibilnih materijala te praćenje biokemijskih i fizikalnih svojstava, kao i rasta stanica, omogućuje generiranje nadomjestaka koji mogu obnoviti ili znatno poboljšati funkciju oštećenih tkiva.

U ovom radu, istražen je utjecaj različite topografije elektroispredenih polimernih nosača polikaprolaktona (PCL) na uspješnost zasijavanja i rasta stanica. Kolektori su dizajnirani programom 123D Design te su zatim 3D printani. Nosači polikaprolaktona i antibiotika Cefuroxima, CFU®, pripremljeni su elektroispredanjem, u koncentracijama antibiotika, 14 % PCL + 15 % mas. i 14 % PCL + 20 % mas.CFU®. Morfološka struktura pripremljenih nosača prije i nakon zasađivanja HeLa stanica, praćena je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM), a biofunkcionalnost nosača ispitana je MTT testom. Temperature kristalizacije (T_k) i taljenja (T_m) PCL/CFU® nosača te stupanj kristalnosti (χ_c) određeni su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC), dok je toplinska stabilnost materijala praćena tehnikom termogravimetrije (TG). Dobiveni rezultati mikrostrukture nosača korelirani su s rezultatima dobivenih temperatura transformacija te koncentracijom antibiotika, kao i rasprostranjenošću i rastom stanica na nosaču.

Ključne riječi: tkivno inženjerstvo, elektroispredanje, PCL, Cefuroxim®, biokompatibilnost

THERMAL ANALYSIS OF BIOCOMPATIBLE MATERIALS FOR TISSUE ENGINEERING

SUMMARY:

Tissue engineering provides a great opportunities in the development of artificial organs, especially biological regenerative materials, such as cartilage, bone and skin. Designing the appropriate biodegradable and biocompatible materials and investigation of their biochemical and physical properties as well as cell growth factors, makes it possible to generate substitutes that can restore or substantially improve the function of damaged tissues.

In this paper, the effect of different topographies of electrospun Polycaprolactone fibrous carrier on the incorporation and cell growth was investigated. Polymer carriers with different structure and porosity, have been prepared by electrospinning of PCL/CEFUROXIM® (CFU®) solution at the designed and 3D printed collectors. Polymer solution was prepared with different concentrations of antibiotic CFU®, 15 and 20 %wt. Fibrous morphology was followed by scanning electron microscopy (SEM), while biocompatibility was detected by MTT test. Melting (T_m) and crystallization (T_c) temperatures of PCL/CFU® as well as degree of crystallinity (χ_c) were determined by differential scanning calorimetry (DSC), while thermal stability of material was obtained by thermogravimetry (TG). Results of PCL/CFU® carrier microstructure were correlated with transformation temperatures and antibiotic concentrations as well as cell growth.

Keywords: tissue engineering, electrospinning, PCL, Cefuroxim®, biocompatibility

SADRŽAJ

1. UVOD 13
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Tkivno inženjerstvo 2
2.1.1. Izvanstanična-matriks struktura 3
2.2. Priprema nosača elektroispredanjem 4
2.2.1. Parametri procesa elektroispredanja 5
2.3. Primjena elektroispredenih materijala 6
3. EKSPERIMENTALNI DIO 8
3.1. Materijali i priprema uzoraka 8
3.2. Izrada 3D printanih kolektora 8
3.3. Elektroispredanje polimernog nosača 9
3.4. Nasađivanje stanica na biokompatibilni nosač 10
3.5. Karakterizacija pripremljenih nosača 11
3.5.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) 11
3.5.2. Termogravimetrija (TG) 12
3.5.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) 13
4. REZULTATI I RASPRAVA 14
4.1. Toplinska svojstva nosača 14
4.1.2. Toplinska stabilnost nosača 17
4.2. Morfološka struktura nosača 19
5. ZAKLJUČAK 27
6. LITERATURA 28
7. ŽIVOTOPIS 30

1. UVOD

Tkivno inženjerstvo je disciplina u kojoj se uz pomoć načela inženjerstva i biologije nastoje izraditi funkcionalne zamjene za oštečena tkiva i organe. Ljudski organizam, tkiva i organi skloni su povredama i oštećenjima kao što su manje rane, iščešenja, ogrebotine i blaži lomovi kostiju koji lako zarastaju, ali problem stvaraju potpuno oštećeni organi, koji više nemaju svoju funkciju u ljudskom tijelu, i veliki lomovi kostiju koji teško zarastaju. Tkivno inženjerstvo predstavlja riješenje ovog problema. U tkivnom inženjerstvu se na prirodne ili sintetičke nosače nanose stanice tkiva te se u odgovarajućim uvjetima omogućuje rast stanica, njihova interakcija te reparacija oštećenog tkiva. Tkivno inženjerstvo se pokazalo uspješnim za regeneraciju tkiva kože, srca, bubrega i jetre.

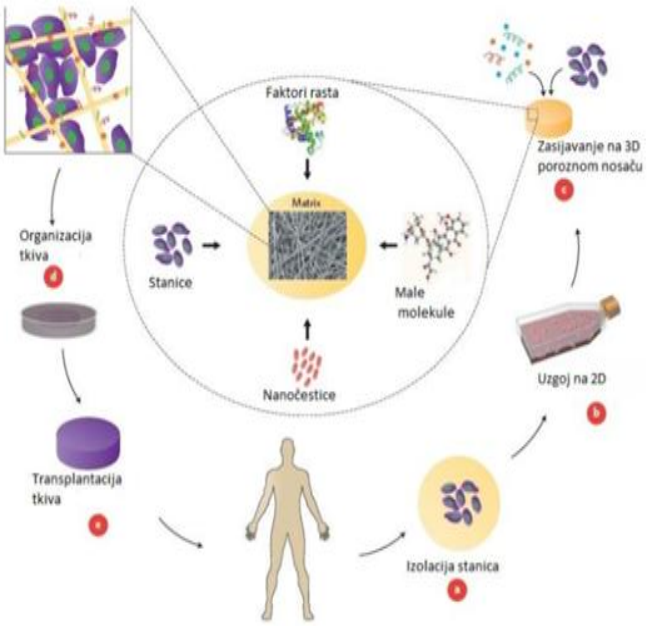
Elektroispredanje je tehnika koja pomoću elektrostatičkih sila polimernu otopinu ili talinu pretvara u fina vlakna. Koristi se za izradu biokompatibilnih i/ili biorazgradivih nosača koji se koriste u biomedicini za prijenos i otpuštanje lijeka unutar organizma u ciljanoj terapiji. Prednost elektroispredanja u odnosu na druge konvencionalne metode je što dobivena vlakna imaju manji promjer i veću specifičnu površinu. U ovom radu pripremljene su otopine za elektroispredanje s 14% polimera polikaprolaktona PCL uz dodatak 15% i 20% mas. antibiotika Cefuroxim®, CFU®. Za elektroispredanje dizajnirano je 5 kolektora različite topografije. Nakon što su elektroispredanjem dobiveni nosači, na njih su nasađene HeLa stanice kako bi se ispitala biokombatibilnost nosača. Također su ispitana toplinska svojstva biorazgradljivog nosača, njegova stabilnost i morfološka struktura te je provedeno istraživanje utjecaja dizajna 3D strukture nosača na rast i distribuciju stanica, s ciljem boljeg razumjevanja interakcije stanica s okolinom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Tkivno inženjerstvo

Tkivno inženjerstvo (TE) je novo područje znanstvenog istraživanja koje obuhvaća primjenu biokompatibilnih materijala i stanica, s ciljem rekonstrukcije i regeneriranja tkiva i organa. Na prirodne ili sintetičke nosače nanose se stanice tkiva te se odgovarajućim uvjetima omogućuje rast stanica, njihova interakcija i reparacija oštećenog tkiva (slika 1.) [1] Jedna od mnogih primjena tkivnog inženjerstva odnosi se na transplataciju organa, koja je ograničena brojem donora i visoke cijene samog procesa, što rezultira velikim brojem ljudi koji svake godine čekaju na nove organe. [2] Tkivno inženjerstvo pokazalo se uspješnim za regeneraciju tkiva kože, srca, bubrega i jetre te potencijalno čak i ispravljanja nekih urođenih mana. U većini slučajeva, tkiva i organi potrebni su odmah za postupak transplantacije, kao što je slučaj primjerice u nesrećama, ratovima i prirodnim katastrofama te je manjak potrebnih organa ozbiljan problem današnjice. Tkivno inženjerstvo podrazumjeva produciranje regeneriranog tkiva s funkcijama koje odgovaraju prrodnim tkivima. [3] Stanice korištene u tkivnom inženjerstvu mogu potjecati od istog pacijenta ili od drugog pojedinca, kao i od životinja. [4]

Na slici 1. možemo vidjeti princip djelovanja tkivnog inženjerstva. Stanice se izoliraju iz pacijenta (a), zatim se uzgajaju *in vitro* na dvodimenzionalnoj površini, zasijavaju na porozni nosač zajedno s faktorom rasta i eventualno lijekom. Daljnji rast stanica odvija se u bioreaktoru, koji osigurava optimalne uvijete za organizaciju i funkciju tkiva. Nakon što je funkcionalno tkivo pripremljeno, ono se transplantira na oštećeni dio kako bi se povratila izvorna funkcija. [2]



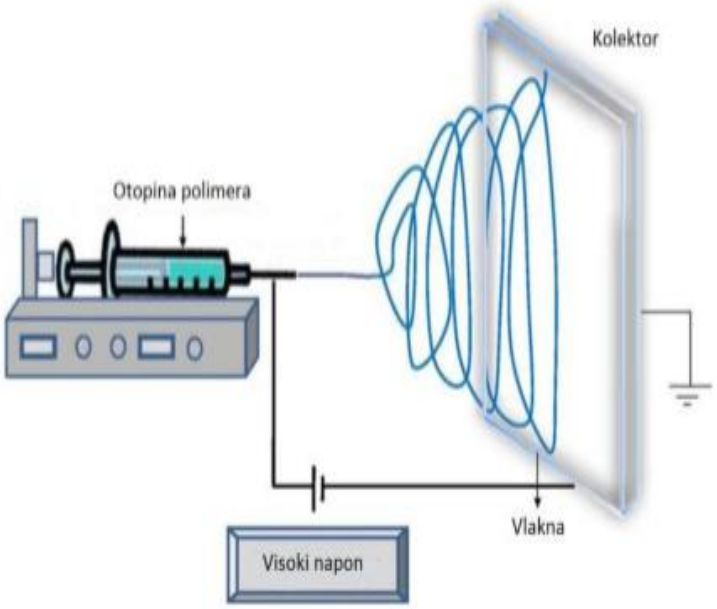
Slika 1. *Koncept tkivnog inženjerstva koji uključuje zasijavanje stanica unutar biokompatibilnog nosača [2]*

2.1.1. Izvanstanična-matriks struktura

Skupine izvanstaničnih molekula koje luče stanice i osiguravaju strukturnu i biokemijsku podršku okolnim stanicama naziva se izvanstanična matriks struktura. Izvanstanična matriks struktura može imati dosta funkcija zbog svoje raznolike naravi i sastava. Neke od tih funkcija su pružanje strukturne podrške, odvajanje tkiva i reguliranje intercelularne komponente, reguliranje dinamičnog ponašanja stanica, izdvajanje širokog raspona staničnih čimbenika rasta i pohranjivanja istih. Za procese kao što su rast, zacjeljivanje rana i fibroza neophodno je formiranje izvanstaničnog matriksa. Kako bi se potaknulo *in vivo* ponašanje stanica najvažniji čimbenik u tkivnom inženjerstvu je odabir i konstruiranje prikladnih podloga. Zbog toga je trodimenzionalna (3D) struktura umjetnog izvanstaničnog matriksa jako važna u upravljanju strukturom i mehaničkim karakteristikama. [5]

2.2. Priprema nosača elektroispredanjem

Postupak elektroispredanja najčešće se koristi za izradu poroznih biokompatibilnih nosača, radi svoje jednostavnosti i niske cijene koštanja. Definira se kao jedinstvena tehnika pri kojoj se pomoću elektrostatičkih sila iz polimerne otopine ili taline stvaraju fina vlakna. Elektroispredanje se temelji na elektrohidrodinamičkim principima, pri čemu elektrificirani viskozni fluid putuje kroz zrak na kolektor sa suprotnim električnim potencijalom. [6] Vlakna dobivena ovom tehnikom imaju znatno manji promjer te veću specifičnu površinu u odnosu na druga vlakna dobivena konvencionalnim tehnikama ispredanja. [7] Za proces elektroispredanja potrebno je: kolektor vlakana, mlaznicu te izvor visokog napona. Sam proces elektroispredanja odvija se uvođenjem tijeka polimerne otopine/taline u elektrostatičko polje visokog napona. Potrebno je priključiti dvije visoko naponske elektrode, od kojih se jedna priključuje na kapilarni uređaj za elektroispredanje, a druga na kolektor vlakana. [6] Budući da se teži stanjivanju nabijenog mlaza, važno je korištenje električnog polja jer pod utjecajem elektrostatskih sila i pri visokoj brzini deformacije dolazi do stvaranja vlakana. Kada električne sile nadjačaju površinsku napetost polimerne otopine/taline i uzrokuju izbacivanje električki nabijenog mlaza, tada dolazi do procesa elektroispredanja. Za istezanje polimernog fluida potreban je izvor istosmjernog napona u rasponu od nekoliko desetaka kV te površina za sakupljanje nastalih finih vlakana. Procesom se formiraju nanovlakna na uzemljenom kolektoru. Elektroispredanje se najčešće provodi na sobnoj temperaturi uz standardne uvjete atmosfere. [8] Nanovlakna spadaju u područje nanoskale koja se kreće od oko 0,1 nm do 1 μm. Elektroispredanjem iz taline dobivaju se vlakna sub-mikro promjera, pa čak i do 250 μm. Kontrolirano elektroispredanje iz taline omogućuje izradu nosača s poroznošću i do 98 %, a uz minimalno elektrostatičko odbijanje između sakupljenih vlakana postiže se 3D struktura nosača. [9] Na slici 2. nalazi se shematski prikaz procesa elektroispredanja. [2]



***Slika 2**. Shematski prikaz elektroispredanja [2]*

2.2.1. Parametri procesa elektroispredanja

Ovisno o materijalu koji se koristi za izradu nosača elektroispredanjem i svojstvima polimerne otopine, ovise i procesni parametri. Morfologija elektroispredenih vlakana ovisi o svojstvima polimerne otopine, kao što su koncentracija, viskoznost, molarna masa, indeks polidisperznosti, polarnost, vodljivost polimera, površinska napetost itd. [10] Niska viskoznost uzrokuje defekte u strukturi nosača, dok viša viskoznost utječe na veći promjer vlakana. Povećanjem koncentracije povećava se promjer vlakana, dok se povećanjem vodljivosti smanjuje promjer. Veća površinska napetost rezultira nestabilnim mlazom, a povećanjem molekularne mase smanjuju se defekti u strukturi nosača. [11] Procesni parametri koji utječu na konačnu strukturu poroznog nosača su: intezitet električnog polja, brzina elektroispredanja, dizajn te udaljenost igle i kolektora i vrijeme elektroispredanja. Parametri okoline koji također utječu na kvalitetu procesa i konačnog mata uglavnom su: relativna vlažnost zraka, temperatura i brzina strujanja zraka. [9]

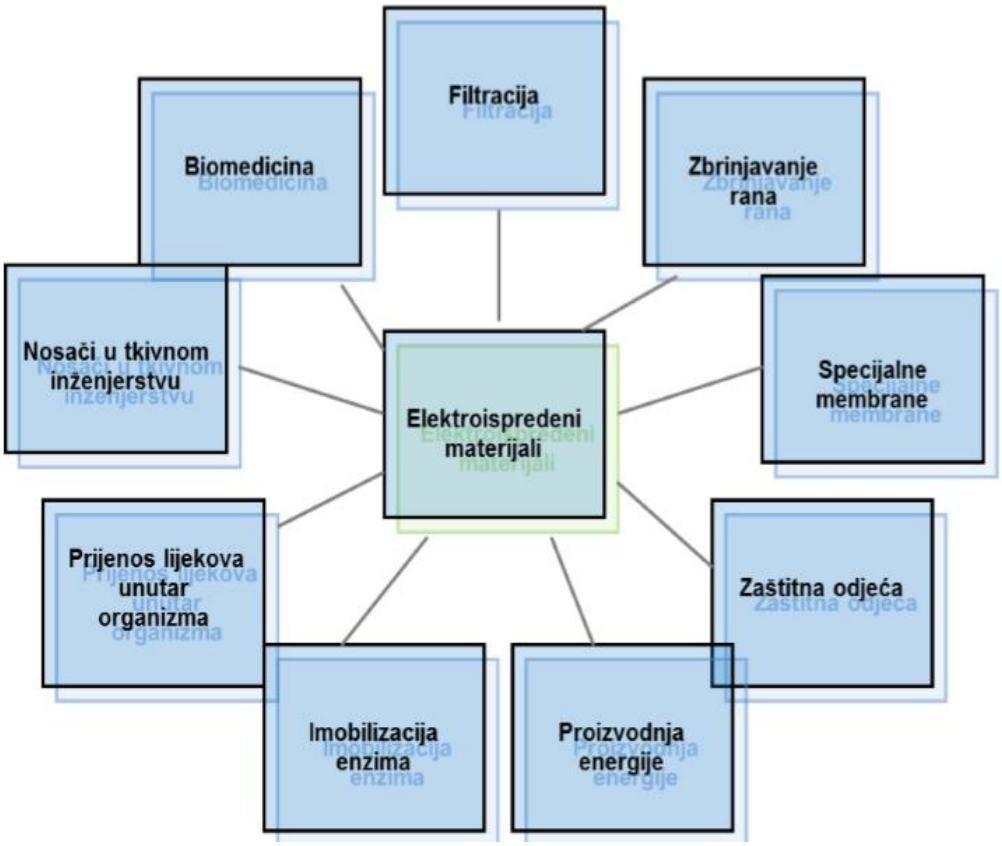
Brzina protoka polimerne otopine važan je procesni parametar s obzirom da utječe na brzinu mlaza i brzinu prijenosa materijala. Poželjna je niža brzina protoka polimerne otopine, kako bi otapalo imalo dovoljno vremena za isparavanje. [11]

Također je utvrđeno da postoji minimalna udaljenost između igle i kolektora koja omogućuje polimernim vlaknima vrijeme potrebno za sušenje prije taloženja na kolektoru. U suprotnom, pri manjoj ili većoj udaljenosti stvorile bi se kapljice otopine. [12] Visoka relativna vlažnost zraka rezultirat će stvaranjem pora na vlaknima, dok viša temperatura okoline vodi do smanjenja promjera vlakana. [12,13]

Osim navedenih parametara koji direktno utječu na morfologiju vlakana, u postupku elektroispredanja važan parametar koji utječe na pozicioniranje ili raspored vlakana, a samim time i na izgled elektroispredenog materijala, je dizajn kolektora. Najednostavniji oblik kolektora je ravna ploča prekrivena s aluminijskom folijom. Kao kolektori mogu se koristiti vodljivi papir, vodljive tkanine, žičane mreže, igle, rotirajući štapovi, valjci, diskovi, koagulacijske kupelji, metalni kolektori ciljane geometrije, 3D printani kolektori i sl. [13]

2.3. Primjena elektroispredenih materijala

Prednost elektroispredenih materijala kao što su visoka poroznost, veliki omjer površine prema volumenu i poboljšana fizikalno-mehanička svojstva razlog su primjene ovih materijala u različitim područjima (slika 3.). Također je moguće lako manipulirati parametrima procesa , te karakteristikama polimerne otopine da bi se dobila željena morfologija vlakana i mehanička čvrstoća.[14] Područje biomedicine jedno je od najopsežnijih područja primjene elektroispredenih materijala. Tkivno inženjersto također spada u primjenu elektroispredenih materijala jer elektroispredanje pruža jednostavniji i isplativiji način proizvodnje vlaknastih nosača pogodnih za uzgoj tkivnih stanica pri rekonstrukciji tkiva. [15] Nosači koji se koriste u tkivnom inženjerstvu predstavljaju trodimenzionalne biokompatibilne strukture čija je osnovna funkcija omogućiti prianjanje tkivnih stanica. Svrha nosača je da služe kao privremene podloge za rast tkivnih stanica i distribuciju prije regeneracije biološki funkcionalnog tkiva. [16]



Slika 3. *Područja primjene elektroispredenih materijala [14]*

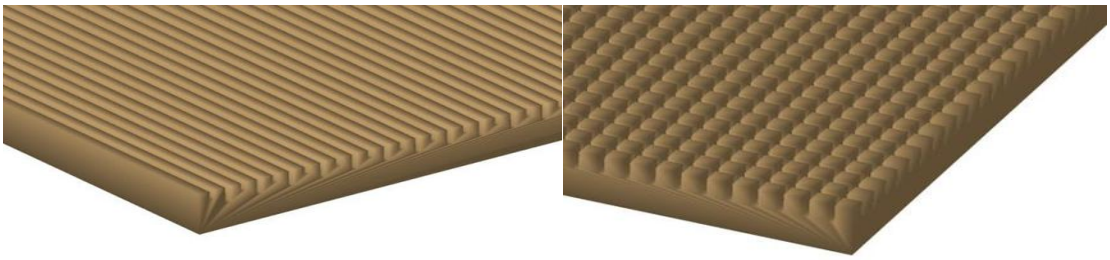
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i priprema uzoraka

Biokompatibilni nosači pripremljeni su od polikaprolaktona (PCL), proizvođača Sigma Aldrich, molekulne mase 80000 $gmol^{-1}$, $M_w/M_u < 2$ i gustoće 1,145 $gmol^{-1}$ pri 25 °C. Pripremljena je 14% polimerna otopina PCL-a u mješavini otapala, glacijalne octene kiseline i acetona u volumnom omjeru 8:2. PCL je najprije otopljen u glacijalnoj octenoj kiselini, uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici kroz 12 sati, nakon čega je dodan aceton uz zagrijavanje pri temperaturi od 50 °C. U otopinu je zatim dodan antibiotik CEFUROXIM®, u koncentraciji od 15 % mas. i 20 % mas. te je otopina dodatno homogenizirana na magnetskoj mješalici kroz 1 sat.

3.2. Izrada 3D printanih kolektora

Dizajniranje kolektora provedeno je programima 123D Design i Catia V5 te su kolektori printani na 3D printeru Form Labs. Dimenzije pripremljenih kolektora, 3 rebrasta i 2 mrežasta, dane su u tablici 1, a primjeri kolektora na slici 4 .



Slika 4. *Primjer rebrastog i mrežastog kolektora*

Tablica 1. *Dimenzije 3D printanih rebrastih i mrežastih kolektora*

Rebrasti	Visina 1. rebra	Visina 2. rebra	Širina	Debljina
Kolektor 1	1,2 mm	0,6 mm	0,6 mm	0,3 mm
Kolektor 2	1,2 mm	0,6 mm	0,8 mm	0,3 mm
Kolektor 3	1,2 mm	0,6 mm	1 mm	0,3 mm
Mrežasti	Visina mreže			
Kolektor 4	1,2 mm	0,6 mm	0,6 mm	0,3 mm
Kolektor 5	1,2 mm	0,6 mm	1 mm	0,3 mm

3.3. Elektroispredanje polimernog nosača

Elektroispredanje čistog PCL-a i pripremljenih otopina PCL+ 15 %mas. CFU® i PCL+ 20 % mas. CFU® provedeno je na uređaju NT-ESS- 300, NTSEE Co. Ltd. South Korea (slika 5.). Uređaj se sastoji od pumpe i izvora visokog napona i rotirajućeg cilindra, tj. kolektora. Elektroispredanje je provedeno pri naponu od 17 kV, brzinom 1 ml/h, kroz 2 sata. Volumen polimerne otopine bio je 2 ml, a udaljenost vrha igle i kolektora 18 cm. Na 3D printanim kolektorima nanesen je grafit te su oni pričvršćeni na cilindar.



***Slika 5**. Uređaj za elektroispredanje: 1.- pumpa i igla*

2.- izvor visokog napona, 3. - kolektor

3.4. Nasađivanje stanica na biokompatibilni nosač

Ispitivanje biokompatibilnosti nosača provedeno je s HeLa stanicama. Nosači su najprije očišćeni, sterilizirani i izloženi UV zračenju 60 minuta. HeLa stanice pripremljene su u Petrijevoj posudi u kulturi DMEM i s govođim serumom te inkubirane na temperaturi 37 ° C u atmosferi 95% O2 i 5% CO2. Testiranje je provedeno 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testom, nakon 24 i 72 sata.

3.5. Karakterizacija pripremljenih nosača

3.5.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Temperaturne transformacije biokompatibilnih nosača određene su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom na uređaju DSC Mettler-Tolledo 822e (slika 6.). Ispitivanja su provedena u temperaturnom području od -100 °C do 80 °C, u atmosferi dušika, pri brzini zagrijavanja/hlađenja od 10 °C/ min.



Slika 6. *Diferencijalni pretražni kalorimetar Mettler-Tolledo 822e*

3.5.2. Termogravimetrija (TG)

Toplinska stabilnost materijala određena je na uređaju TG A Q500, TA Instruments (slika 7.) u temperaturnom intervalu od 25°C do 700 °C, u atmosferi dušika te uz brzinu zagrijavanja 10 °C/min.



Slika 7*. Termogravimetar Q500, TA Instruments*

3.5.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfološka struktura elektroispredenih nosača snimljena je skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) Tescan Vega TS 5136 MM (slika 8.), pri naponu od 20 kV i na povećanjima od 46 x, 500x, 2000x i 6000x.



Slika 8. *Skenirajući elektronski mikroskop Tescan Vega TS 5136 MM*

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Toplinska svojstva nosača

4.1.1. Ispitivanje temperature transformacija i kristalnosti

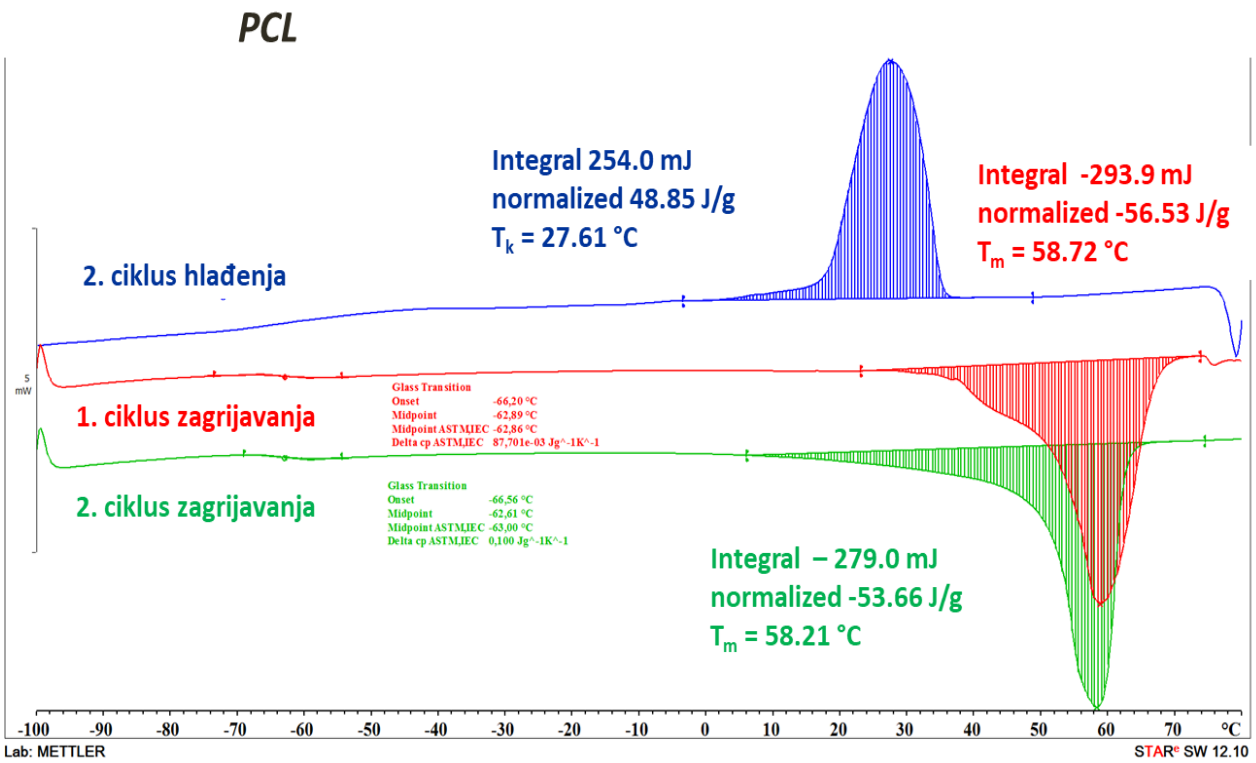
Na slici 9. prikazan je DSC termogram za čisti polikaprolakton (PCL). Iz termograma se može vidjeti da je temperature staklišta (T_g) PCL-a određena pri -62°C, u oba ciklusa zagrijavanja. Temperatura taljenja također je u oba ciklusa utvrđena pri 58 °C, no entalpija taljenja je nešto niža u 2. ciklusu zagrijavanja. DSC analiza pokazala je semikristaliničnu strukturu PCL-a, s kristalištem pri temperature od 27 °C. Dobiveni rezultati u korelaciji su s dosadašnjim istraživanjima čistog polikaprolaktona. [19] Utjecaj antibiotika CFU® na promjenu toplinskih svojstava biokompatibilnih nosača vidljiva je na slikama 10. i 11. Može se vidjeti da dodatkom 15 %mas. i 20 % mas. antibiotika CFU® nije došlo do promjene temperature taljenja (T_m), dok se temperatura kristalizacije (T_k) povisila, što ukazuje da antibiotik može djelovati kao nukleacijski agens za PCL (slika 10. 11., tablica 4). Entalpija kristalizacije također se povisila dodatkom lijeka, osobito pri 20 % mas. CFU®. Stupanj kristalnosti (χ) za PCL/CFU® nosač određen je prema jednadžbi (1) i raste s povećanjem koncentracije lijeka CFU® (tablica 2.).

$$\chi = \frac{\Delta H_p}{\Delta H_o} * 100\% \qquad (1)$$

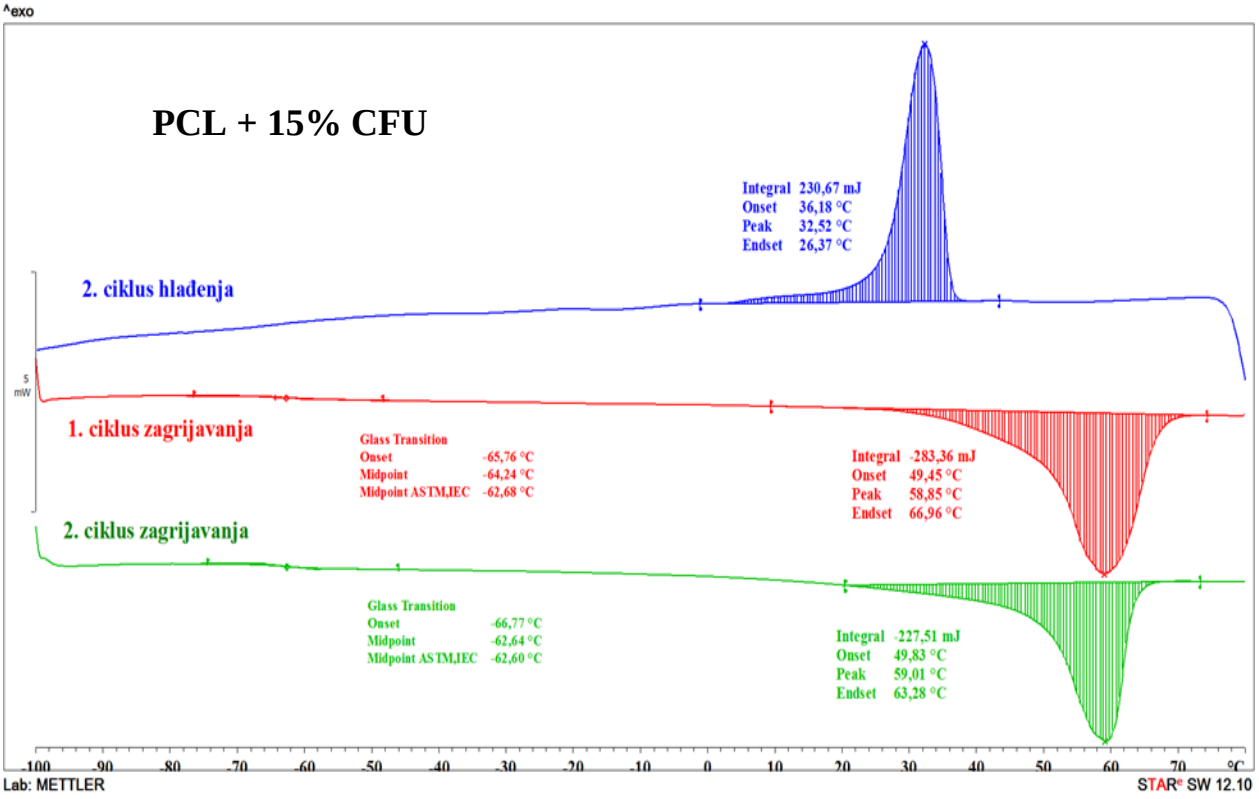
gdje je:

ΔH_p – parcijalna entalpija taljenja (J/g)

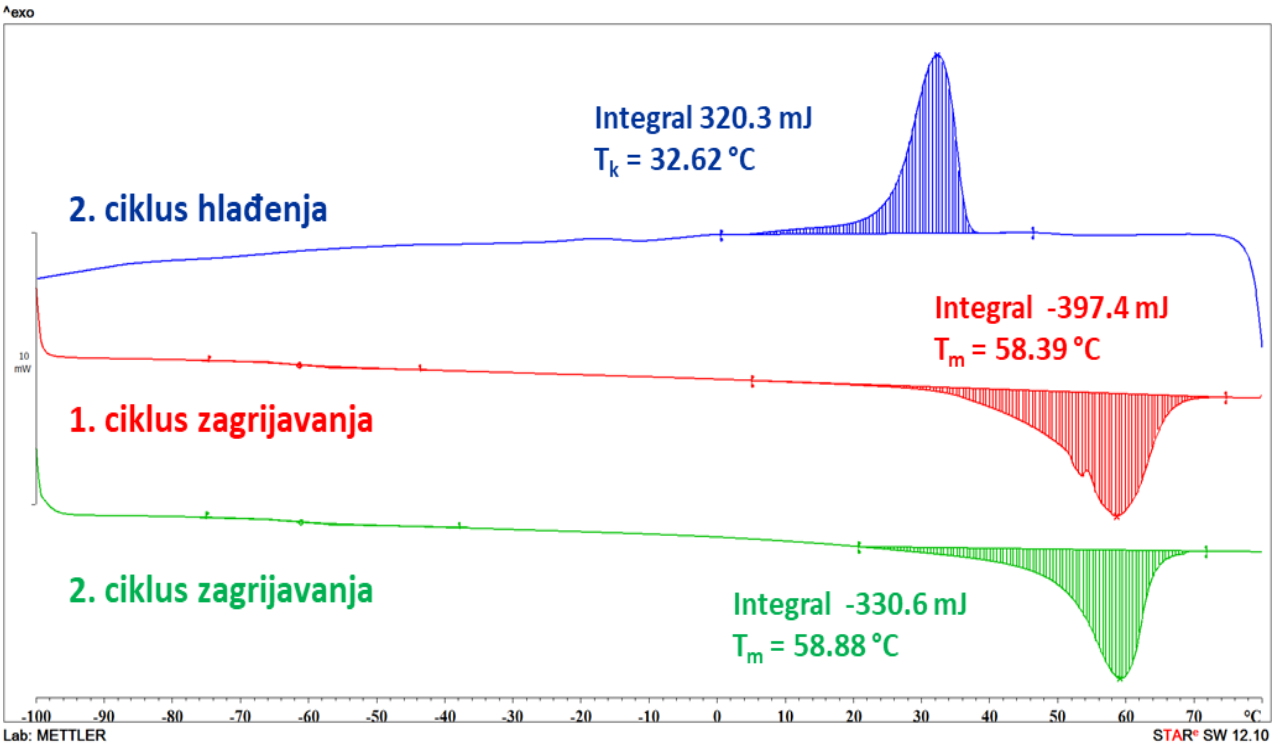
ΔH_0 - entalpija taljenja za 100% kristalni PCL (142 J/g).



Slika 9. *DSC termogram za PCL nosač*



Slika 10. *DSC termogram za PCL+ 15% mas. CFU® nosač*



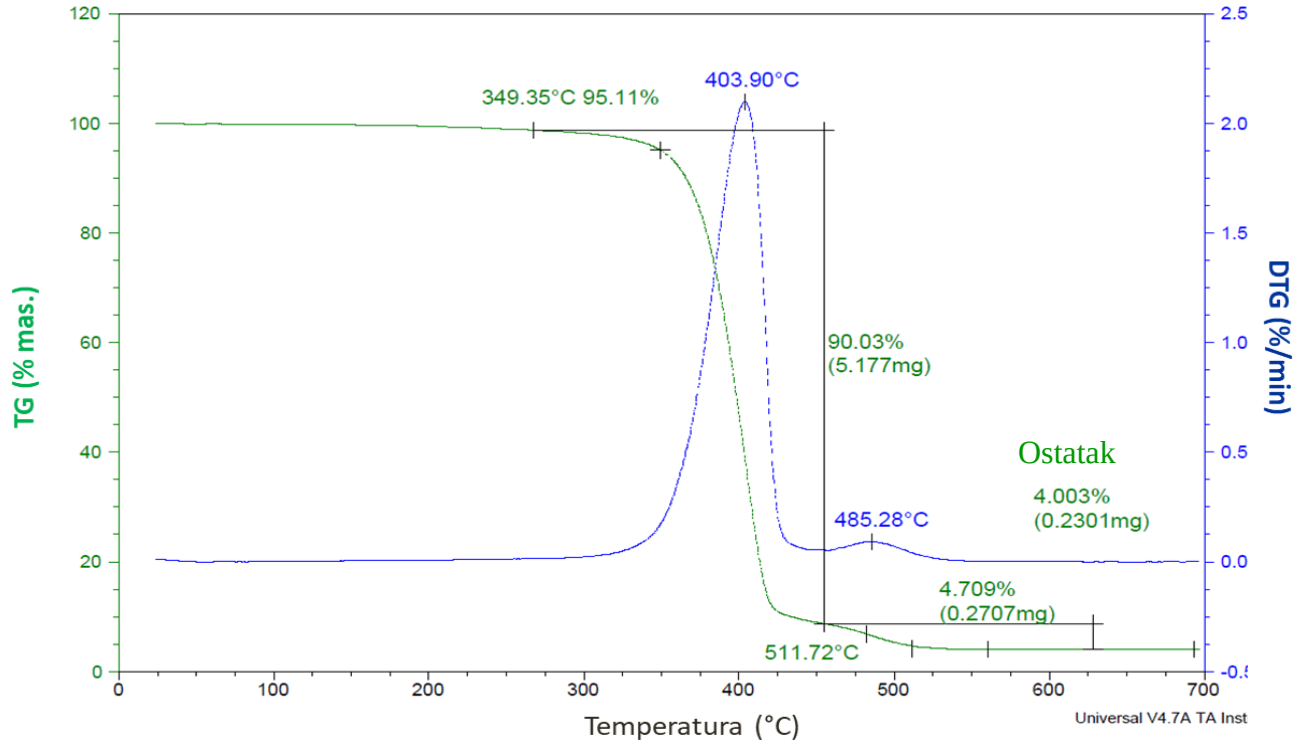
Slika 11. *DSC termogram za PCL+20% mas. CFU® nosač*

***Tablica 2**. Rezultati DSC analize nosača PCL/CFU®*

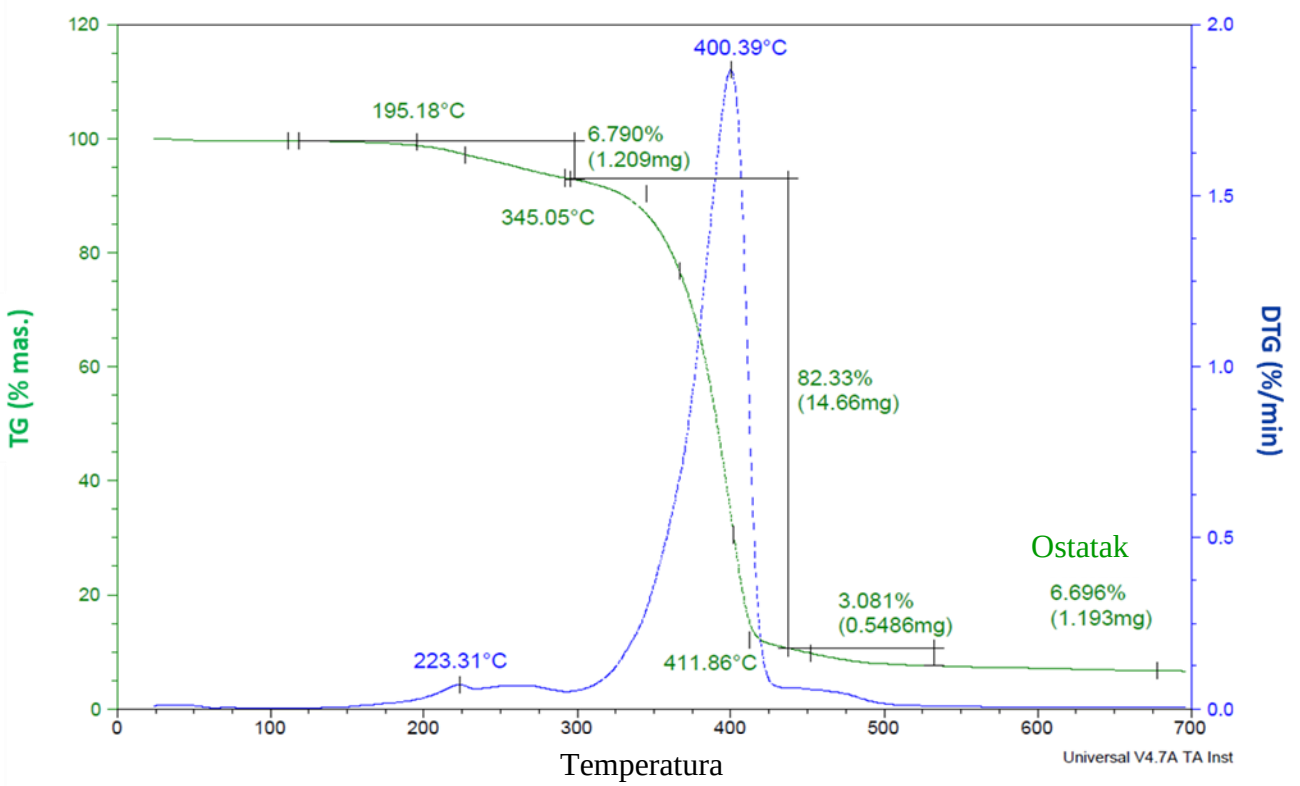
Uzorak	Temperatura taljenja, T_m [°C]	Temperatura kristalizacije, T_K [°C]	Entalpija taljenja, ΔH_m [J/g]	Entalpija kristalizacije, ΔH_C [J/g]	Stupanj kristalnosti, χ [%]
PCL	58.21	27.61	53.66	48.85	37.78
PCL + 15% mas. CFU®	59.01	32.62	55.78	52.47	39.28
PCL + 20% mas. CFU®	58.88	32.62	62.39	60.44	43.94

4.1.2. Toplinska stabilnost nosača

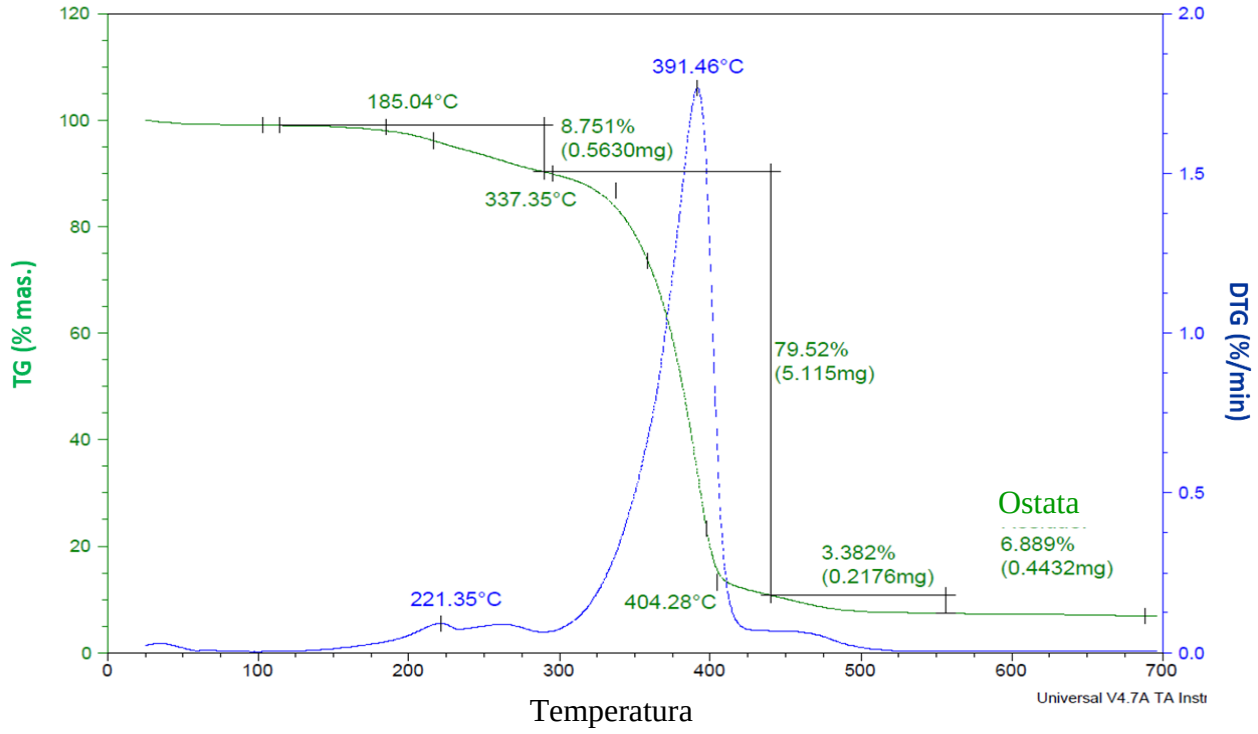
Rezultati termogravimetrijske analize pokazuju da se razgradnja čistog PCL-a u inertnoj atmosferi odvija u dva stupnja, s početnom temperaturom razgradnje pri 349 °C (slika 12). Prema dosadašnjim istraživanjima čistog polikaprolaktona [20, 21], prvi stupanj vezan je uz pucanje polimernog lanca kroz cis-eliminaciju, nakon čega dolazi do eliminacije monomera. Derivativna krivulja (DTG) pokazuje dva pika, vezana uz infleksiju intervala gubitka mase na TG krivulji, pri temperaturama od 404 °C i 485°C (slika 12). Dodavanjem antibiotika CFU®, mehanizam razgradnje elektroispredenog nosača odvija se u tri stupnja, s početnom temperaturom razgradnje pri 195°C, što je značajno niže u odnosu na čisti PCL (slika 13). Povećanjem koncentracije lijeka nastavlja se smanjenje toplinske stabilnosti nosača, i razgradnja nosača sa 20 % mas. lijeka počinje pri temperaturi od 185 °C (slika 14.)



Slika 12. *TG i DTG krivulje za PCL nosač*



Slika 13*. TG i DTG krivulje za PCL + 15% mas. CFU® nosač*

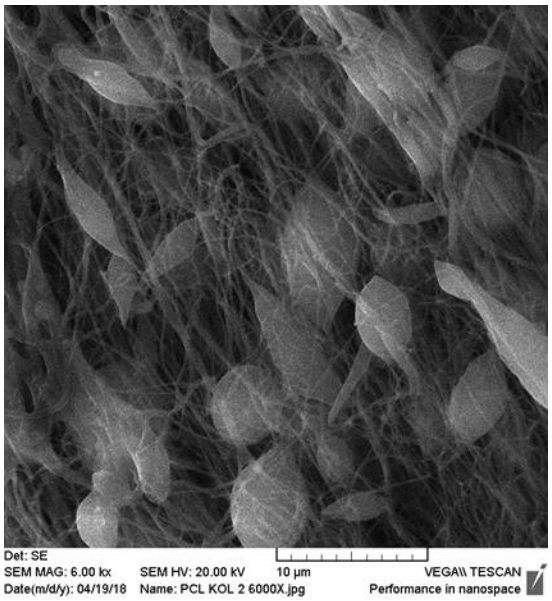


Slika 14. *TG i DTG krivulje za PCL+20 % mas. CFU® nosač*

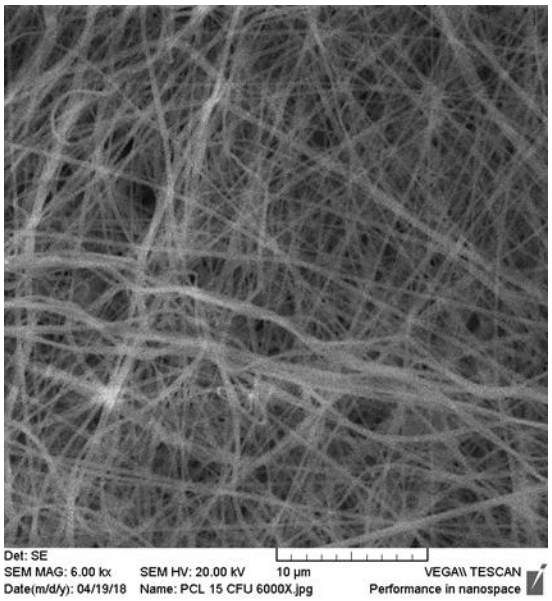
4.2. Morfološka struktura nosača

Morfološka struktura elektroispredenih PCL/CFU® nosača sa različitim koncentracijama antibiotika, pripremljenih na rebrastom kolektoru 2 (Tablica 1), dana je na slici 15. Na slici 15a može se vidjeti da mat od čistog PCL-a pokazuje dosta defekata u strukturi vlakana, što je posljedica nestabilnosti elektroispredanja te niže viskoznosti otopine. Osim viskoznosti, na stvaranje defekata utječe i viskoelastičnost te površinska napetost polimerne otopine. Dodatkom 15% mas. CFU®, dolazi do formiranja jednoličnih vlakana, ravnomjerno raspoređenih u poroznoj mreži mata, čime se ova koncentracija pokazala kao najoptimalnija u provedenom istraživanju (slika 15b.). Daljnje povećanje koncentracije lijeka, do 20 % mas., opet vodi do stvaranja aglomerata u vlaknima (slika 15c). S obzirom da je 15 % mas. lijeka otpimalna koncentracija, nosači ove otopine pripremljeni su na kolektorima različitih topografija (slika 16.). Rezultati su pokazali da razlika u dizajnu i topografiji rebrastih i mrežastih kolektora ne utječe značajno na svojstva elektroispredenih vlakana, no širina utora na rebrastom kolektoru utječe na promjer vlakana. Finija i tanja vlakna dobivena su na kolektorima 1 i 2 (Tablica 1), dok se na rebrastom kolektoru s najširim rebrom (kolektor 3) mogu uočiti djelomična zadebljanja vlakana (slika 16c). Na slici 17. dan je prikaz rezultata MTT testa, iz čega je vidljivo da su se stanice vrlo dobro razvile na PCL/CFU® nosačima svih ispitanih topografija. Najbolji rast stanica pokazali su

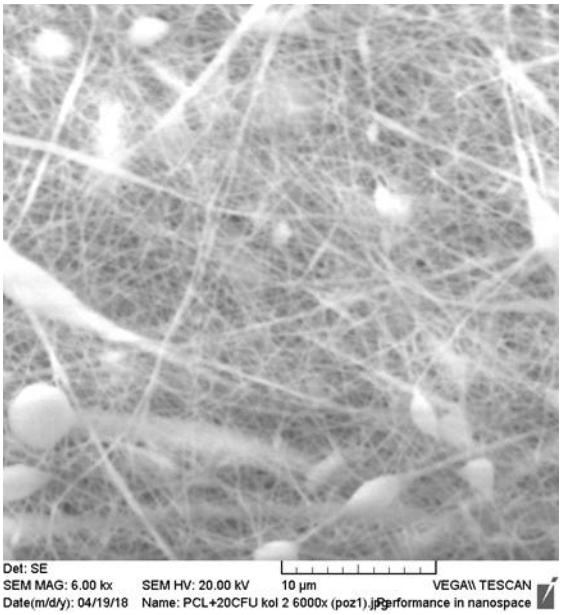
nosači elektroispredeni na kolektorima 2 i 4., što se vidi iz rezultata SEM analize morfološke strukture nanešenih stanica danih na slici 18.



a)

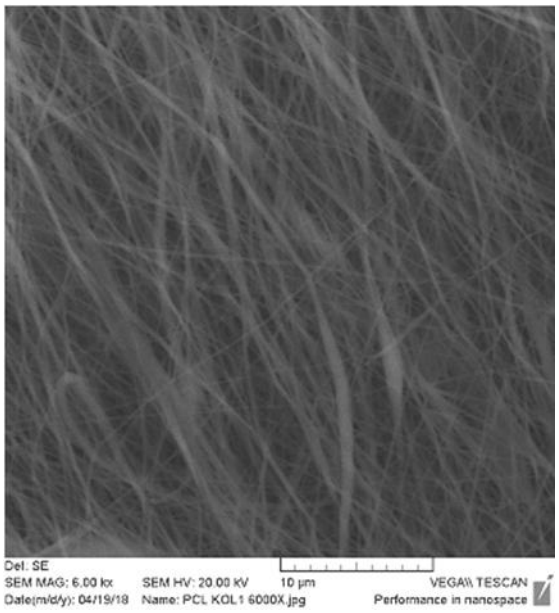


b)

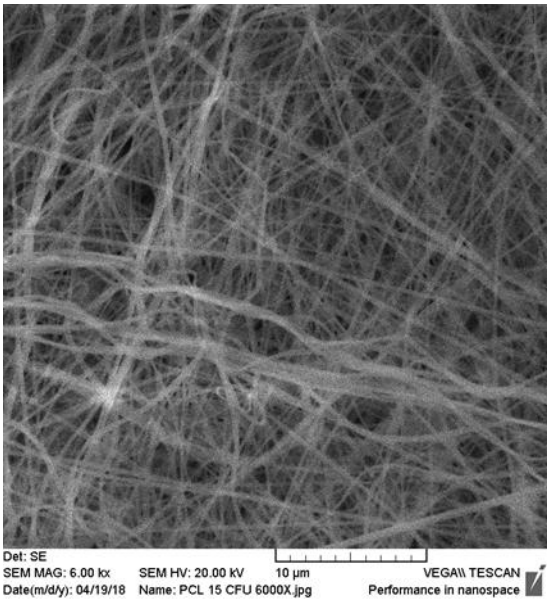


c)

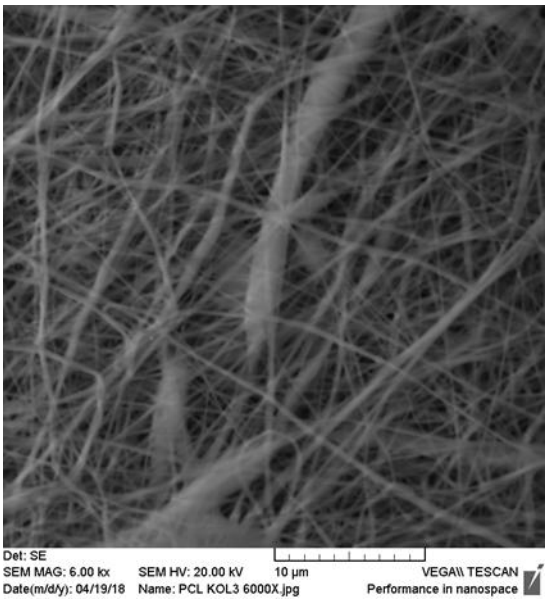
Slika 15. *SEM mikrofotografije za uzorke: a) PCL, b) PCL+15 % mas. CFU®, c) PCL+20 % mas. CFU®*


Det: SE
SEM MAG: 6.00 kx
SEM HV: 20.00 kV
10 µm
VEGA\\ TESCAN
Date(m/d/y): 04/19/18
Name: PCL KOL1 6000X.jpg
Performance in nanospace

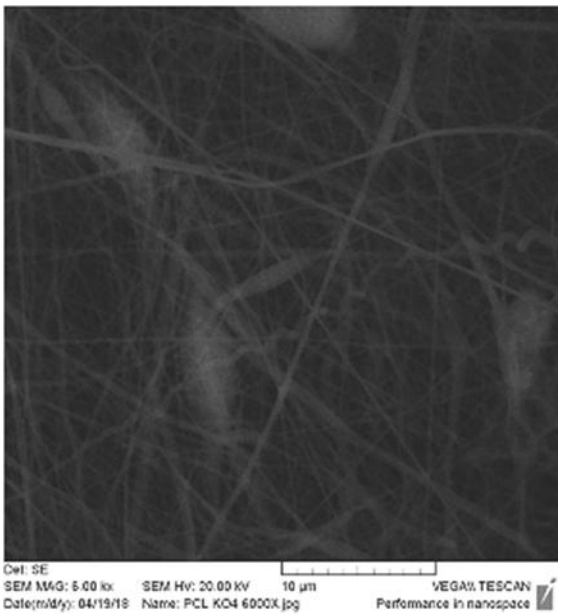
a)


Det: SE
SEM MAG: 6.00 kx
SEM HV: 20.00 kV
10 µm
VEGA\\ TESCAN
Date(m/d/y): 04/19/18
Name: PCL 15 CFU 6000X.jpg
Performance in nanospace

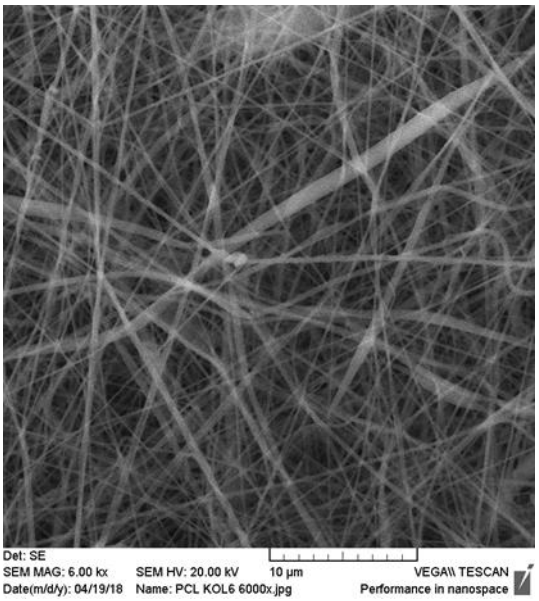
b)


Det: SE
SEM MAG: 6.00 kx
SEM HV: 20.00 kV
10 µm
VEGA\\ TESCAN
Date(m/d/y): 04/19/18
Name: PCL KOL3 6000X.jpg
Performance in nanospace

c)

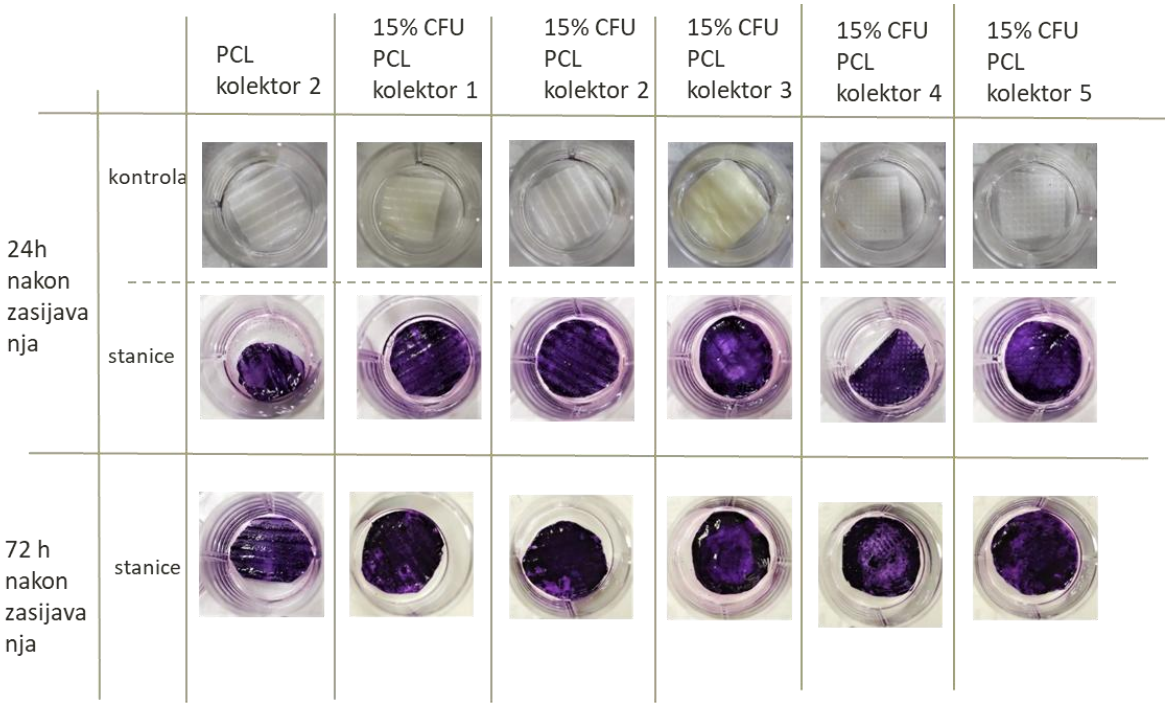

Det: SE
SEM MAG: 6.00 kx
SEM HV: 20.00 kV
10 µm
VEGA\\ TESCAN
Date(m/d/y): 04/19/18
Name: PCL KO4 6000X.jpg
Performance in nanospace

d)

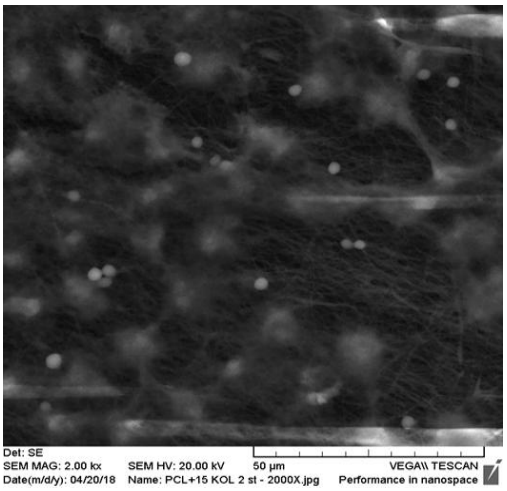


e)

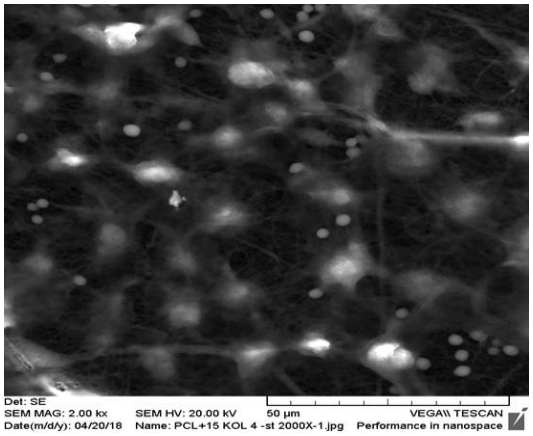
Slika 16*. SEM mikrofotografije za PCL+15 % mas. nosač: a) kolektor 1, b) kolektor 2, c) kolektor 3 d) kolektor 4 i e) kolektor 5*



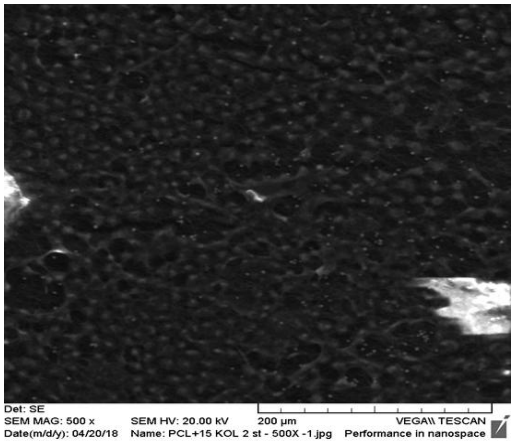
Slika 17. *Rezultati MTT testa*


Det: SE
SEM MAG: 2.00 kx
SEM HV: 20.00 kV
50 µm
VEGA\\ TESCAN
Date(m/d/y): 04/20/18
Name: PCL+15 KOL 2 st - 2000X.jpg
Performance in nanospace

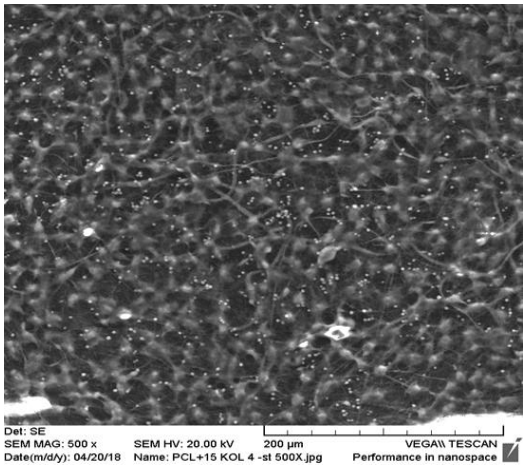
a)


Det: SE
SEM MAG: 2.00 kx
SEM HV: 20.00 kV
50 µm
VEGA\\ TESCAN
Date(m/d/y): 04/20/18
Name: PCL+15 KOL 4 -st 2000X-1.jpg
Performance in nanospace

b)



c)



d)

Slika 18. *SEM mikrofotografije nanešenih stanica na nosač PCL + 15 % mas.: a) kolektor 2 (povećanje 500x), b) kolektor 4 (povećanje 500x), c) kolektor 2 (povećanje2000 x), d) kolektor 4 (povećanje 2000x)*

5. ZAKLJUČAK

U radu su pripremljeni nosači PCL s različitim koncentracijama antibiotika Cefuroxim® te je ispitan utjecaj različitih topografija kolektora na morfologiju elektroispredenih nosača. Elektroispredanje se pokazalo kao vrlo uspješna tehnika proizvodnje nosača za primjenu u tkivnom inženjerstvu.

Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom uočeno je kako se dodatkom antibiotika CFU® temperatura kristalizacije povisila, što ukazuje da antibiotik djeluje kao nukleacijski agens i povećava kristalnost polikaprolaktona (PCL). Istovremeno, dodavanjem lijeka smanjuje se toplinska stabilnost nosača. Morfološka struktura pokazala se najbolja pri 15 % mas. antibiotika te je došlo do formiranja finih, homogenih elektroispredenih vlakana bez stvaranja zadebljanja i defekata. Najbolja topografija za elektroispredanje nosača pokazala se na kolektorima 1, 2 i 5, a rezultati pokazuje da rebrasta i mrežasta topografija daju sličnu morfologiju mreže, ali širina rebra utječe na debljinu vlakana. PCL nosači s lijekom mogu se uspješno primjeniti u regeneraciji tkiva i ciljanoj terapiji, što je vidljivo iz testa biokompatibilnosti koji je pokazao uspješno nasađivanje i rast stanica na svim elektroipredenim nosačima.

6. LITERATURA

[1] Langer R., Vacanti J. P., *Tissue engineering*, Science, 260, 920–926 (1993).

[2] Krmpotić E., Tominac P., *Izrada i karakterizacija elektroispredenih nosača s uzorkovanom topografijom za uzgoj ljudskih stanica kože (ili oka)*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjersta i tehnologije, Zagreb, 2017.

[3] Guan X., Avci-Adali M., Alarcin E., *Development of hydrogels for regenerative engineering*, Biotechnology Journal, 12, 5 (2017), 23-32.

[4] Atala A., *Regenerative medicine strategies*, Journal of Pediatric Surgery, 471 (2012) 17-28.

[5] Yannas I.V., *Emerging rules for inducing organ regeneration*,Biomaterials, 34, 2, (2013) 321-330.

[6] Dalton P.D., Vaquette C., FarrugiaB.L.,DargavilleT.R., Brown T.D., Hutmacher D.W. *Electrospinning and additive manufacturing: Converging technologies*, Biomater. Sci., 1 (2013) 171-185.

[7] Stranger J., Tucker N., Staiger M., *Electrospinning Repra Review Report*, Report 190, (2005)

[8] Bhardwaj N.,Kundu S.C., *Electrospinning a fascinating fiber fabrication technique*, Biotechnology Advances, 28, 3, (2010) 325-347.

[9] Zhenyu L. et all,, *One-Dimensional nanostructures Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*, Springer, 2013., ISBN 978-3-642-36426-6.

[10] Thandavamoorthy S., *Electrospinning of Nanofibers*, Journal of Applied Polymer Science, 96, (2005) 557-569.

[11] Nezarati R.M., Eifert M.B., Cosgriff-Hernandez E., *Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology*, Tissue Engineering, Part C., 19, 10 (2013) 810-819.

[12] Persano L., *Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review*, Macromolecular materials and engineering, 298 (2013) 504-520.

[13] Centola M., Rainer A., Spadaccio C., de Porcellinis S., Genovese J.A., Trombetta M. *Combining electrospinning and fused deposition modeling for the fabrication of a hybrid vascular graft*, Biofabrication, 2, 1 (2010) 1-13.

[14] Čipčić T., *Utjecaj količine antibiotika na svojstva elektroispredenog polikaprolaktona kao podloge za kontroliranu terapiju oka*, Rad za rektorovu nagradu, Sveučilište u Zagrebu, Tekstilno-tehnološki fakultet, Zagreb, 2017.

[15] Park Suk H., *Development of Three Dimensional Scaffolds containing Electrospun Nanofibers and their Applications to Tissue Regeneration*, Magisterski rad, College of engineering, South Korea, 2011.

[16] http://tehnoprogres.hr/?q=content/primjena-aditivnih-tehnologija-u-medicini, 15.08.2019.

[17] https://en.wikipedia.org/wiki/Extracellular_matrix, 15.08.2019.

[18] Karageorgiou V., Kaplan D., *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*, Biomaterials, 26, (2005) 5474–5491.

[19] Vaquette C.,Cooper-White J. J., *Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration*, Acta Biomater., 7, 6, (2011) 2544-2557.

[20] KumbarS.G., James R., Nukavarapu S.P., Laurencin C.T., *Electrospun nanofiber scaffolds:engineering soft tissues*, Biomed. Mater., 3, (2008) 1-15.

[21] Katsogiannis K.A.G., Vladisavljević G.T., Georgiadou S., *Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation*, European Polymer Journal, 69 (2015) 284–295.

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Anamarija Vuković

Adresa: Grada Dubrovnika 42

Datum i mjesto rođenja: 08.04.1997. Sisak

E-mail:anamarijavukovicc@gmail.com

Obrazovanje

2004.-2012. Osnovna škola Viktorovac Sisak

2012.-2016. Tehnička škola Sisak

2016.-2019. Sveučilište u Zagrebu Metalurški fakultet

Osobne vještine

Strani jezik: engleski jezik

Računalne vještine: aktivno korištenje Microsoft Office, osnovna znanja u programiranju, C++, AutoCad

Aktivnosti za vrijeme studija

Sudjelovanje na Tehnologijadi 2017. i 2018.

Sudjelovanje na Međunarodnoj konferenciji stručnog savjetovanja ljevača u Opatiji 2017. i u Sisku 2018.

Sudjelovanje na Sajmu sveučilišta 2017. i 2018.