

Obrada površine nosača s TiO₂ za primjenu u tkivnom inženjerstvu

Peruško, Stefano

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:977947>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Odjel za Tehničke studije



STEFANO PERUŠKO

**OBRADA POVRŠINE NOSAČA S TIO_2 ZA PRIMJENU U TKIVNOM
INŽENJERSTVU**

Završni rad

Pula, listopad, 2019.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Odjel za tehničke studije

STEFANO PERUŠKO

**OBRADA POVRŠINE NOSAČA TIO₂ SA PRIMJENOM U TKIVNOM
INŽENJERSTVU**

Završni rad

JMB: 0303059117, izvanredni student

Studijski smjer: Proizvodno strojarstvo

Predmet: Površinska obrada materijala

Znanstveno područje: Tehničke znanosti

Znanstveno polje: Strojlarstvo

Znanstvena grana: Proizvodno strojarstvo

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tamara Holjevac Grgurić

Pula, listopad, 2019.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisani _____, kandidat za prvostupnika _____ ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student

U Puli, _____, _____ godine



IZJAVA
o korištenju autorskog djela

Ja, _____ dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom

koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, _____ (datum)

Potpis

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

Regenerativna medicina i tkivno inženjerstvo obuhvaćaju razvoj novog tkiva, pomoću prirodnih ili sintetskih nosača, s ciljem regeneriranja, oporavka ili zamjene oštećenog tkiva. Nosači moraju zadovoljiti uvjete biokompatibilnosti, biorazgradljivosti, optimalnih mehaničkih svojstava te moraju biti pogodni za razvoj i rast stanica. Antibakterijska svojstva nosača, hidrofilitnost i bioaktivnost mogu se poboljšati obradom površine nosača. Stoga je u ovom radu ispitan utjecaj koncentracije titanijevog dioksida (TiO_2) na strukturu i toplinsku stabilnost nosača na bazi polikaprolaktona (PCL), pripremljenih procesom elektroispredanja. Također je u nosače enkapsuliran lijek, antibiotik Cefuroxim (CFU[®]), u koncentracijama 15 % i 25 % mas. te je praćen utjecaj antibiotika na formiranje vlakana. Definirana je optimalna koncentracija PCL/CFU[®] otopine za proces elektroispredanja. Polimerni matovi elektroispredani su na kolektore, koji su prethodno dizajnirani programom i 3D printani, u različitim geometrijama. Rezultati istraživanja pokazali su da je modificiranjem s 1 % mas. došlo do vrlo dobre distribucije TiO_2 po površini vlakana. Kao optimalna koncentracija za elektroispredanje pokazala se polimerna otopina s 15 % mas. dodanog antibiotika. Bolji rast stanica ostvaren je na nosačima elektroispredanim na kolektorima rebraste geometrije.

Ključne riječi:

Tkivno inženjerstvo, elektroispredanje, PCL, topografija

SURFACE MODIFICATION OF THE SCAFFOLDS BY TiO₂ FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATION

SUMMARY

Regenerative medicine and tissue engineering concerned with replacement and repair of damaged tissues, by natural or synthetic scaffolds as support for the cell culture. Scaffolds have to be biocompatible, biodegradable, with the optimal mechanical properties and with the suitable structure for cell growth. Antibacterial properties and scaffold bioactivity could be improved by surface modification with TiO₂. Therefore, in this paper the effect of TiO₂ concentration on the morphology and thermal properties of PCL scaffolds was investigated. Further, the antibiotic Cefuroxime (CFU[®]) was encapsulated in two concentrations, 15 %wt. and 25%wt., followed by microstructural analysis of electrospun scaffold structure. Collectors for electrospinning were designed with different geometry and then 3D printed. Results showed that addition of 1 %wt. TiO₂ caused very good distribution on the fibers` surface. PCL/15%wt. CFU[®] solution was proved as the most optimal for the electrospinning. Better cell growth was obtained for the ribbed collectors compared with the mesh collectors.

Keywords:

Tissue engineering, electrospinning, PCL, topography

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
4.1 SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)	13
4.1.1 Povijesni razvoj mikroskopije	13
4.1.2 SEM analiza	14
4.2 DIFERENCIJALNA PRETRAŽNA KALORIMETRIJA (DSC)	17
5. ZAKLJUČAK.....	18
LITERATURA.....	33

1. UVOD

Tkivno inženjerstvo je relativno novo područje koje ubuhvaća primjenu biokompatibilnih materijala za proizvodnju tkiva s funkcionalnim svojstvima, sličnim prirodnim tkivima. [1,2] Razvoj tehnologija za izradu prirodnih ili sintetskih nosača je sve intenzivniji, s ciljem pronalaženja najoptimalnije tehnologije za dobivanje trodimenzionalne strukture, koja omogućuje adheziju i rast stanica te formiranje novog tkiva. Ključni faktor za uspješnu regeneraciju i stvaranje novog tkiva je osiguravanje odgovarajuće okoline za rast stanica, interakciju, difuziju i stanični metabolizam. Stoga je pronalaženje optimalnih postupaka i parametara za dobivanje željene strukture nosača, izuzetno bitno za razvoj odgovarajućeg tipa tkiva. [3,4]

Jedna od tehnologija pripreme nosača za primjenu u bioinženjerstvu, koja se pokazala vrlo uspješnom, je elektroispredanje. Konvencionalno elektroispredanje osigurava uglavnom stvaranje 2D strukture nosača, no za kvalitetnu migraciju stanica unutar nosača te komunikaciju stanica i nutritijenata, neophodni su nosači sa poroznom 3D strukturom. Osnovni zahtjevi koji se postavljaju pred materijale koji se koriste pri elektroispredanju su: biokompatibilnost, biorazgradljivost i optimalna mehanička svojstva. Modificiranje površine nosača omogućuje dodatno poboljšavanje specifičnih svojstava materijala, primjerice hidrofилности, antibakterijskih svojstava te mehaničkih svojstava.

Stoga je izazov proizvesti nosač ciljane 3D strukture, sa željenom orijentacijom elektroispredanih vlakana, najpogodniji za razvoj određenog tipa tkiva. U ovom radu, istražen je utjecaj modifikacije površine polikaprolaktona s titanijevim dioksidom na toplinska svojstva i morfologiju elektroispredanih nosača. Također je ispitan utjecaj geometrije 3D printanih kolektora u procesu elektroispredanja na arhitekturu i poroznost mreže, kao i rast stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Regenerativna medicina i tkivno inženjerstvo

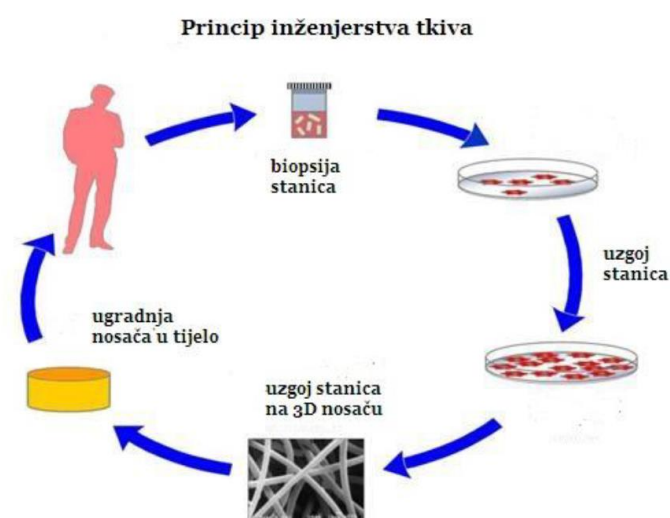
Regenerativna medicina je područje koje se intenzivno razvija u posljednjem desetljeću, s osnovnim ciljem obnavljanja, održavanja i poboljšanja tjelesnih funkcija ljudskog organizma. [5] Tkivno inženjerstvo je dio područja regenerativne medicine, koje podrazumjeva pružanje učinkovite i konzistentne terapije te razvoj tkiva i organa s funkcionalnim svojstvima, sličnim prirodnim organima. [1]

Ljudsko tijelo ima veliku sposobnost regeneracije i oporavka putem matičnih stanica, koje pokazuju dva bitna svojstva, sposobnost samoobnavljanja i sposobnost diferencijacije. Pod određenim uvjetima matične stanice mogu stvarati različite tipove stanica u definiranoj mikrookolini.

Tkivno inženjerstvo podrazumjeva:

1. izoliranje stanica iz tijela i njihov uzgoj u odgovarajućoj kulturi,
2. nanošenje stanica na polimerni nosač (eng. *scaffold*),
3. stvaranje funkcionalnog tkiva *in vitro* te njihovo presađivanje.

Osnovni princip tkivnog inženjerstva prikazan je na slici 1.



Slika 1. Princip tkivnog inženjerstva

Stanice mogu biti direktno uzete iz ljudskih organa, razvijene iz prekursora i matičnih stanica ili proizvedene u laboratoriju. Idealno je da su sve uzete upravo od pacijenta kako ne bi došlo do odbacivanja novog organa.

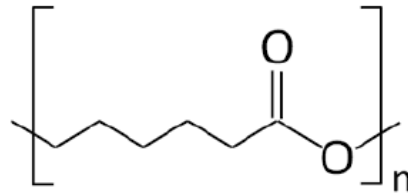
Tkivno inženjerstvo obuhvaća izradu sintetskih ili prirodnih nosača, koji omogućuju svojom poroznom strukturom interakciju, rast i razvoj stanica, uz istovremenu regeneraciju tkiva (tablica 1). Nosač se zatim prilikom ugrađivanja u organizam pacijenata zamjenjuje prirodno nataloženom izvanstaničnom matricom (ECM). [6] Nosači koji se koriste u tkivnom inženjerstvu moraju biti biokompatibilni i biorazgradljivi. Biokompatibilnost nosača podrazumjeva kompatibilnost materijala sa biološkim sustavom. Nakon ugradnje, nosač mora biti netoksičan te ne smije izazvati imunološku reakciju u organizmu. U posljednje vrijeme su sve veći zahtjevi za biorazgradljivim materijalima, kako bi se izbjeglo trajno zaostajanje nosača u ljudskom tijelu. Biorazgradnja nosača također mora podrazumjevati stvaranje netoksičnih produkata, kao i vrijeme razgradnje koje je u korelaciji s vremenom potrebnim za stvaranjem novog tkiva. [6]

Kako bi se utvrdila reakcija tkiva na strani materijal te kako bi se razvili najpovoljniji materijali za izradu nosača, provode se razni testovi, uglavnom *in vitro* metode, kako bi se dobila informacija o citotoksičnosti, profileraciji stanica i diferencijaciji. *In vitro* testovi omogućuju ispitivanje materijala nosača i odabir isključivo onih materijala koji povećavaju biološku sigurnost i nemaju toksični učinak na stanice.

Osnovni *in vitro* testovi su ispitivanje citotoksičnosti, kojim se ispituje vijabilnost stanica tj. aktivnost stanica na nosaču, i bojanje (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) bojom, MTT test, kojim se ispituje stanična metabolička aktivnost, odnosno održivost stanica na nosaču.

Materijali koji se koriste za izradu nosača mogu biti prirodni ili sintetski. [7] Prirodni nosači najčešće su od fibroina, kolagena, hitosana, kazeina, hitina i dr., izvrsne biokompatibilnosti, no uglavnom vrlo slabe procesabilnosti. Kao sinteski nosači koriste se uglavnom polimerni ili kompozitni nosači, najčešće nosači od polilaktido-glikolida (PLGA), polikaprolaktona (PCL), poliglikolida (PGA), poli-L-laktida (PLLA), poliuretana (PU), itd. [8,9]

Polikaprolakton (PCL) je semikristaliničan polimer (slika 2.), koji se razgrađuje u razdoblju od par mjeseci do nekoliko godina, ovisno o uvjetima okoline, molekulskoj masi polimera i stupnju kristalnosti.



Slika 2. Struktura polikaprolaktona

Tablica 1: Tkiva koja se mogu / ne mogu regenerirati

VEZNA TKIVA	
KOSTI	DA
LIGAMENTI, DISKOVI i sl.	NE
KOŽA (EPITEL)	DA
MIŠIČNI SUSTAV	
SRČANI, POPREČNI	NE
GLATKI	DA
ŽIVČANI SUSTAV	NE

2.2. TEHNOLOGIJA PRIPREME NOSAČA

Nosači za primjenu u tkivnom inženjerstvu mogu se pripremiti različitim tehnologijama, primjerice stereolitografijom, depozicijom, laserskim sinteriranjem, bioprintingom i dr. [10] Jedna od najčešće korištenih tehnologija je proces elektroispredanja, radi svoje jednostavne izvedbe i niske cijene koštanja.

2.2.1. Povijesni razvoj tehnologije elektroispredanja

Izraz elektroispredanje izveden je iz izraza „elektrostatičko centrifugiranje“, što predstavlja stari postupak izvlačenja polimernih vlakana. Veliki doprinos metodi dao je Anton Formhals svojim prvim patentom u kojemu je izvijestio o uspješnom rotiranju vlakana celuloznog acetata, gdje je polimerna otopina uvedena u električno polje. [11]

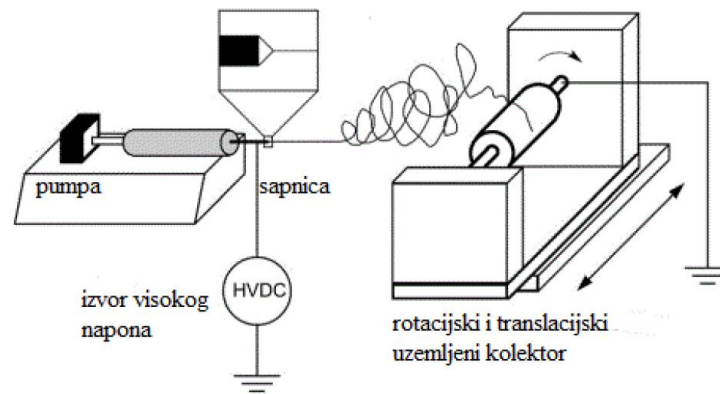
Istraživanja povezana sa ovom metodom značajnije su započeta 2000. godine te od tada njihov broj ubrzano raste. Tako je uglavnom zbog činjenice da raste interes za nanotehnologijama općenito, a fina vlakna nano-dimenzija mogu se relativno lako proizvesti postupkom elektroispredanja.

2.2.2. Proces elektroispredanja

Elektroispredanjem se formiraju kontinuirana vlakna od submikronskih do nanometarskih promjera, i to korištenjem električnog polja visokog potencijala. Prednost ove tehnologije je laka primjenjivost u laboratoriju te mogućnost poboljšavanja i pojednostavljenja postupka za industrijsku proizvodnju. Vlakna dobivena elektroispredanjem imaju veću specifičnu površinu od običnih vlakana, visoku poroznost te intenzivniju međusobnu povezanost vlakana. Najveća prednost procesa elektroispredanja je u kontroliranoj strukturi nosača, što omogućuje postizanje željenih svojstava i funkcionalnosti za specifičnu primjenu. [12] Elektroispredana vlakna se osim u tkivnom inženjerstvu mogu koristiti kao filterska sredstva, zavoja za rane, nosači lijekova, enzima i katalizatora, zaštitna odjeća, senzori, i kao elektronički materijali.

Shematski prikaz procesa elektroispredanja dan je na slici 3. Osnovni dijelovi uređaja su izvor visokog napona, igla i kolektor za sakupljanje vlakana. Djelovanjem elektrostatske sile koja nastaje u električnom polju dolazi do formiranja i ispredanja vlakana. Uslijed površinske napetosti na vrhu igle dolazi do formiranja kapljice polimerne otopine, a djelovanjem naboja induciranog na površini, dolazi do istezanja i formiranja vlakana. Svojstva i struktura elektroispredanog nosača ovisi o parametrima polimerne otopine (koncentracija, viskoznost, površinska napetost, vodljivost), samog procesa (napon, brzina izvlačenja vlakana, udaljenost kolektora od igle, vrijeme ispredanja) te uvjeta okoline (temperatura, vlažnost). [14] Viskoznost i koncentracija značajno utječu na formiranje mreže mata: što je viskoznost manja

to je viša sklonost ka stvaranju defekata u strukturi, dok viša viskoznost i veća koncentracija utječe na formiranje jednoličnijih vlakana, većeg promjera.



Slika 3. Shematski prikaz procesa elektroispredanja [15]

2. 3. 3D STRUKTURA NOSAČA

Nosač mora biti porozne strukture, s velikim omjerom specifične površine i volumena, kako bi se osigurala dobra difuzija i migracija stanica, njihova interakcija te prohodnost hranjivih tvari i metaboličkog otpada. Elektroispredanje omogućuje pripremu nosača 3D strukture, željene arhitekture, čime se osigurava rast stanica u određenom smjeru. Uglavnom, nosači s vlaknima kontroliranih orijentacija pokazuju bolja funkcionalna svojstva *in vitro* i *in vivo*, u odnosu na slučajno raspoređena vlakna. Prostorna geometrija i veličina nano- i mikro-pora te raspoređenost vlakana u mreži nosača, utječu na kemijska, biološka i mehanička svojstva nosača te njihovu razgradnju. [15,16] Dodatnom modifikacijom površine nosača mogu se značajno poboljšati antibakterijska svojstva nosača, hidrofilnost kao i mehanička svojstva osnovnog materijala. U posljednje vrijeme, vrlo su intenzivna istraživanja s titanijevim dioksidom, TiO_2 , s obzirom da on pokazuje veliku stabilnost, netoksičnost, hidrofilnost, UV otpornost i antibakterijska svojstva. [17]

2.3.1. Titanijev dioksid

Titanijev-dioksid je prirodni oksid titana. Ima najviši indeks loma bilo kojeg materijala poznatog čovjeku, čak i dijamanta. Kada se usitni u fini prah, pretvara se u pigment koji daje maksimalnu bjelinu i neprozirnost. Međutim u prirodi titanijev-dioksid nije u korisnoj formi, stoga ga treba pažljivo rudariti u jednoj od njegovih čistih formi, kao što su rutilne pješčane plaže i rafinirati u fine uniformne veličine čestica. TiO_2 se javlja u tri polimorfne modifikacije: anatas (tetragonska kristalna struktura), rutil (tetragonska kristalna struktura) i brukit (romboedarska kristalna struktura) (slika 4). Najčešće se upotrebljava anatas zbog svoje fotokatalitičke aktivnosti te najlakše proizvodnje. [18] Osnovna svojstva koja ga karakteriziraju su visoka fotoosjetljivost, kemijska stabilnost, netoksičnost, dostupnost, niska cijena i prihvatljivost za okoliš.



Slika 4. Polimorfne modifikacije TiO_2 : rutil, anatas, brukit [18]

Stoga se titanijev-dioksid, (TiO_2), upotrebljava u raznim područjima primjene, od heterogene katalize, fotokatalize, u solarnim ćelijama za proizvodnju vodika i električne energije, kao senzor plina, kao bijeli pigment (u bojama i kozmetičkim proizvodima), kao premaz za zaštitu od korozije, kao optički premaz, keramike te u električnim uređajima kao što su otpornici. Njegova primjena u tkivnom inženjerstvu postaje sve intenzivnija posljednjih godina. Za dobivanje titanijevog-dioksida, (TiO_2), s kontroliranim veličinama čestica visoke homogenosti i porozne strukture, koristi se sol-gel postupak. [18]

2.3.2. Sol-gel postupak

Sol-gel postupak je metoda pripreme organsko-anorganskih hibridnih materijala čime se osiguravaju svojstva polaznih komponenti. Sol je koloidna otopina krutih čestica u tekućini, dok je gel polukruta masa koja nastaje kada otapalo iz sol-a počinje isparavati, a čestice i ioni koji su se zaostale, počnu se povezivati u kontinuiranu mrežu. Do formiranja gela dolazi kada se homogena disperzija stvrdne. Prekursor je reaktant koji sadrži kation, koji je dio gela ili sola.

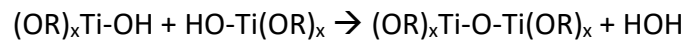
U sol-gel postupku koriste se titanovi alkoksidi: titanov butoksid i etoksid, opće formule $Ti(OR)_4$.

Sol-gel postupak obuhvaća [18]:

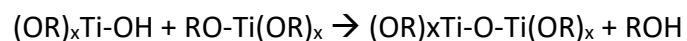
1. Hidroliza TiO-R veze, potom

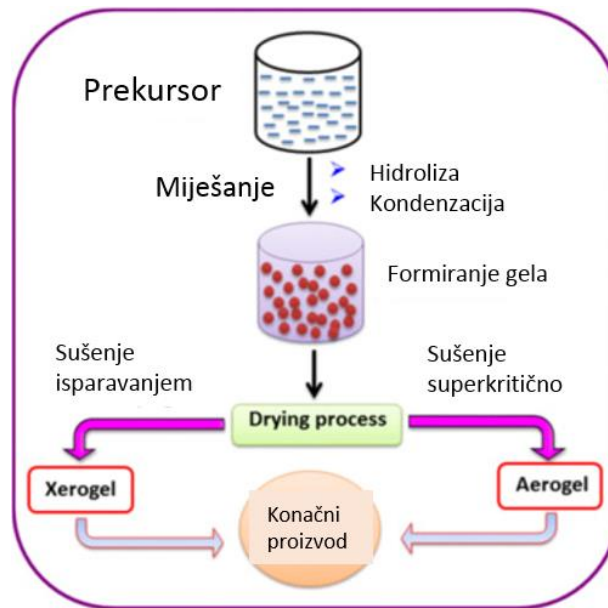


2. Kondenzacija uz izdvajanje vode (vodena kondenzacija), ili



3. Kondenzacija uz izdvajanje alkohola (alkoholna kondenzacija)

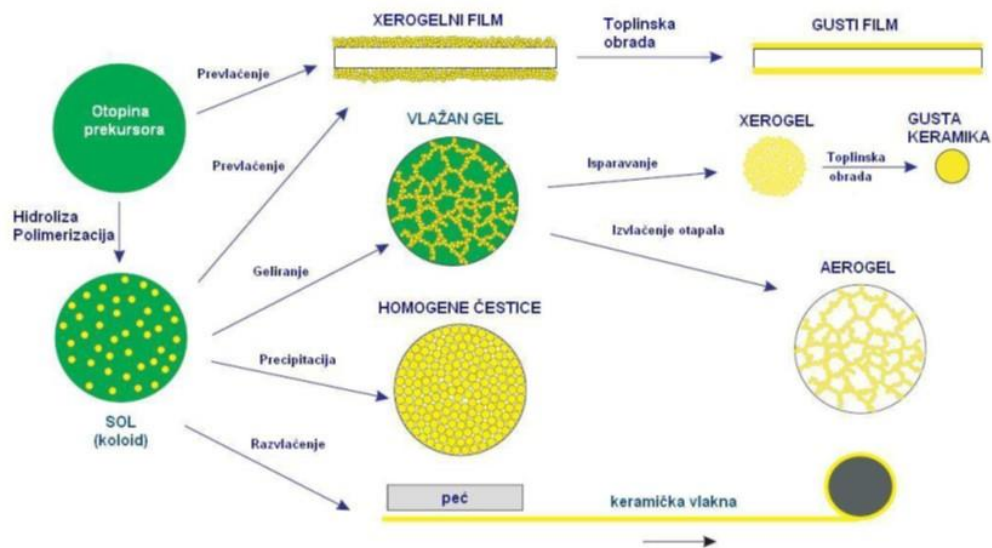




Slika 5. Skica Sol-gel postupka [19]

Sol-gel postupak može dati različite materijale (slika 6) i uobičajeno se odvija kroz 5 faza/stupnjeva: [20]

- Hidroliza i polikondenzacija
- Geliranje
- Dozrijevanje („starenje“)
- Sušenje
- Zgušnjavanje i kristalizacija



Slika 6: Detaljna shema odvijanja sol-gel postupka s istaknutim fazama [21]

Hidroliza i polikondenzacija

Hidroliza je kemijska reakcija ili postupak u kojem se kemijski spoj razgrađuje u reakciji s vodom. Polikondenzacija najzastupljenija stupnjevita polimerizacija kojom se monomeri kovalentnim vezama povezuju u polimere. Ukoliko se želi izbjeći kondenzacija (gel) u sustav se mogu dodati kelatni agensi. Veći ligandi često usporavaju proces hidrolize. [22]

Parametri koji utječu na proces kondenzacije:

- Vrsta prekursora;
- Omjer alkoksida i vode;
- Vrsta katalizatora;
- Vrsta otopine;
- Temperatura;
- Kislost (pH);
- Relativne i apsolutne koncentracije reaktanata.

Geliranje

Gel raste formirajući mrežu, koja se proteže kroz cijeli spremnik. Kada se gel formira, velik broj čestica još uvijek neće reagirati. Stoga je starenje vrlo bitna faza u procesu. [22]

Starenje

Kako se viskoznost brzo povećava, otapalo je "zarobljeno" unutar gela. Struktura se značajno mijenja s vremenom, ovisno o pH, temperaturi i otapalu. Gel je još uvijek "živ". Tekuća faza sadrži još sol čestica i aglomerata, koji će nastaviti reagirati, te će se kondenzirati dok se gel ne osuši. Gel je izvorno fleksibilan. Susjedne grupe će se kondenzirati, čineći gel još viskoznijim. Ovo će iscijediti tekućinu iz unutrašnjosti gela, pri čemu se volumen smanjuje. Proces se nastavlja sve dok postoji fleksibilnost u gelu.

Sušenje

Uklanjanjem tekućine iz gela može doći do par ishoda. Gel je zamijenjen zrakom te se mogu pojaviti velike promjene u strukturi mreže. Održavanjem strukture dolazi do stvaranja aerogela. Raspadom strukture formira se xerogel. Kada je naprezanje u gelu toliko veliko da se više ne može smanjiti dolazi do puknuća. Plin ulazi u pore sa tankim filmom tekućine. Ispariti će ostavljajući samo izolirana mjesta sa tekućinom.

Zgušnjavanje i kristalizacija

Završne toplinske obrade piroliziraju preostale organske ili anorganske komponente i tvore amorfni ili kristalni premaz.

Prednosti sol-gel postupka jesu: [21]

- Visoka čistoća prekursora;
- Dobivaju se homogene prevlake jednolike debljine;
- Niska temperatura odvijanja postupka;
- Jednostavna oprema;
- Postupak nije vakumski;
- Ima veliku prilagodljivost;
- Mogućnost prevlačenja velikih ali vrlo glatkih površina;
- Niska cijena;
- Kontrola mikrostrukture;

- Može proizvesti tankoslojnu prevlaku kako bi se postigla izvrsna adhezija između metalne podloge i gornjeg sloja;
- Može se proizvesti debeli sloj koji služi kao zaštita protiv korozije;
- Materijali se lako mogu oblikovati u složene geometrije u dok su u stanju gela;
- Može proizvesti proizvode visoke čistoće jer organo-metalni prekursor željenih keramičkih oksida može biti pomiješan, otopljen u određenom otapalu i hidroliziran u sol, a potom gel, smjesa može biti visoko kontrolirana.

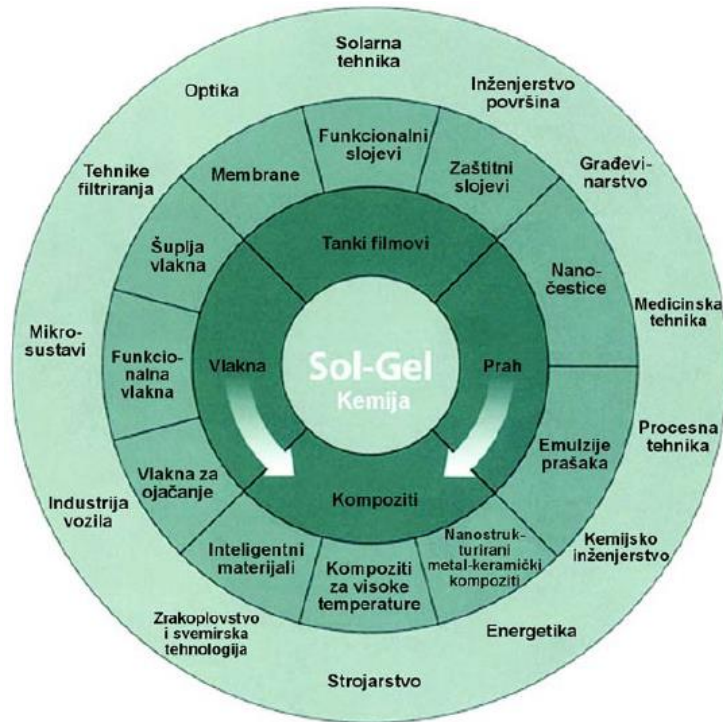
Nedostaci sol-gel postupka: [21]

- Skup polazni materijal;
- Ograničenje procesa na oksidne i polimerne materijale (ne-oksidne materijale moguće je ugraditi u sol-gel matricu i dobiti novi materijal);
- Pojedini alkoksidi su prereaktivni;
- Poteškoće pri sintezi više komponentnih materijala u pogledu idealne homogenosti (različita je reaktivnost prekursora – kondenzacije ne ide istodobno za oba materijala).

2.3.2.1. Primjena sol-gel postupka

Sol-gel postupak se može koristiti u procesima proizvodnje keramike, kao materijal za investicijsko lijevanje ili kao sredstvo za proizvodnju vrlo tankih folija metalnih oksida za različite svrhe. Sol-gel materijali imaju različite primjene u optici, elektronici, energiji, svemiru, (bio) sensorima, medicini (npr. nosači s kontroliranim otpuštanjem lijeka) i separaciji (npr. kromatografija). Jedna od važnijih primjena sol-gel obrade je provođenje sinteze zeolita. Ostali elementi (metali, metalni oksidi) mogu se jednostavno ugraditi u konačni proizvod, a silikalni sol nastao ovom metodom je vrlo stabilan. [23]

Ostali proizvodi napravljeni ovim postupkom uključuju različite keramičke membrane za mikrofiltriranje, ultrafiltraciju, nanofiltraciju, pervaporaciju i reverznu osmozu. Najčešće primjene sol-gel postupka prikazane su na slici 7.



Slika 7. Primjena sol-gel postupka [22]

2.4. TEHNIKE KARAKTERIZACIJE MATERIJALA

2.4.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

2.4.1.1. Povijesni razvoj mikroskopije

Mikroskopi su instrumenti uz pomoć kojih možemo vidjeti povećane slike malih predmeta. Vrlo je teško reći tko je izumio prvi mikroskop, no prvi zapisi o mikroskopu sežu u XVII. stoljeće i vežu se uz imena Roberta Hookea (1635.-1703.) i Anton van Leeuwenhoek (1630.-1723.). Van Leeuwenhoek se koristio mikroskopom s jednom moćnom konveksnom lećom i podesivim držačem za objekt koji se promatrao. S tim vrlo jednostavnim mikroskopom Van Leeuwenhoek je mogao povećati objekte do 500 puta. Takvim mikroskopom otkrio je eritrocite, leukocite, spermatozoide, bakterije i sl. Daljnji razvoj tog mikroskopa išao je u smjeru dodavanja leće koja bi povećala sliku prve leće. Izumiteljem prvog složenog mikroskopa (dvije leće) razvijenom u ovom pravcu smatra se R. Hooke. U današnje vrijeme mikroskopima se obično nazivaju

složeni optički instrumenti s dva sustava leća (objektivom i okularom) koji na svakom kraju metalne cijevi (tubusa) imaju po jedan sustav leća. Na donjem kraju, iznad promatranog predmeta nalazi se objektiv, a na gornjem kraju okular. Objektiv je u modernim mikroskopima sastavljen od više leća male žarišne duljine koja djeluje kao konveksna leća. Svi svjetlosni mikroskopi rade na jednakom principu. Za stvaranje povećane slike predmeta koriste snop svjetlosti. Snop svjetlosti osvjetljava objekt koji promatramo te zatim prolazi kroz optički sustav mikroskopa koji omogućuje stvaranje njegove povećane slike. Moderni svjetlosni mikroskopi mogu postići povećanje do 3.000x te omogućavaju oku da razluči objekte koji su međusobno udaljeni i do 0,0002 mm. U nastojanju da se postigne što bolje razlučivanje i na taj način omogući promatranje još sitnijih struktura, utvrđeno je da moć razlučivanja mikroskopa nije ograničena samo brojem i kvalitetom leća, već također i valnom duljinom svjetlosti koja se koristi za osvjetljavanje promatranog objekta. [24]

Skenirajući elektronski mikroskopi (SEM) počeli su se pojavljivati u komercijalnoj upotrebi sredinom 60-ih godina XX. stoljeća. Zbog svojih prednosti ispred ostalih mikroskopa, vrlo brzo su postali nezamjenjiv alat u širokom opsegu znanstvenih i tehnoloških operacija. Iako su proizvođači SEM-a nastavili poboljšavati tehnologiju i napravili značajne pomake u rezultatima i korištenju, u osnovi SEM je ostao nepromijenjen gotovo 20 godina.

2.4.1.2. SEM analiza

Dvije glavne komponente SEM-a su elektronska kolona koja se sastoji od elektronskog oružja te dvije ili više elektronskih leća, koje utječu na putove elektrona koji putuju niz izvučenu cijev. Baza kolone obično se uzima pomoću vakuum pumpi koje stvaraju vakuum od oko 10^{-4} Pa (oko 10^{-6} torr ili otprilike milijardu tlaka atmosferskog tlaka). Kontrolna konzola sastoji se od zaslona za gledanje katodne cijevi (CRT) i gumba i tipkovnice računala koji upravljaju elektronskim snopom. [25]

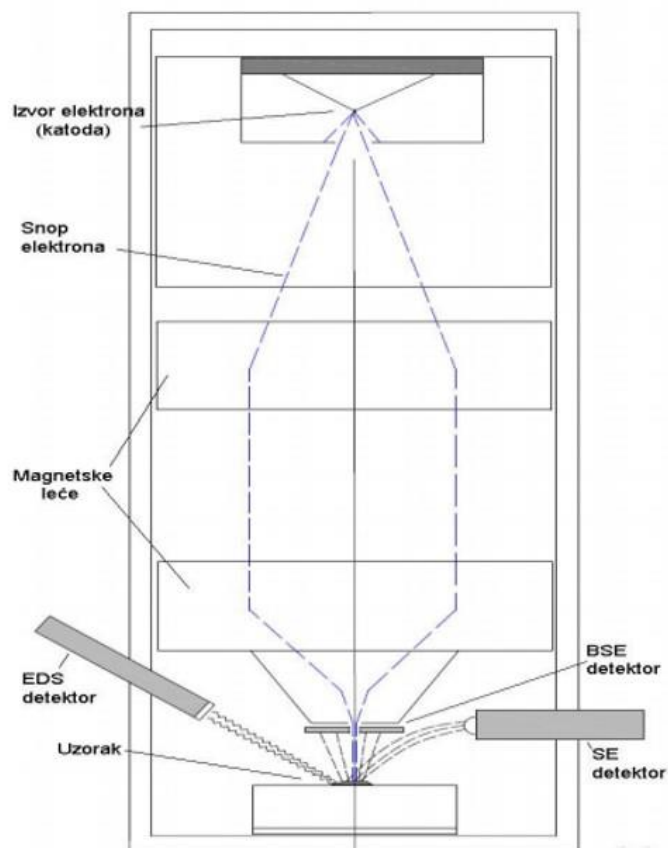
Osnove rada skenirajućeg elektronskog mikroskopa sastoje se od skeniranja površine ispitivanog uzorka vrlo precizno fokusiranim snopom elektrona. Snop elektrona pobuđuje (izbija) elektrone u sastavu atoma uzorka. Energija elektrona iz snopa u izravnoj je proporciji s

interaktivno pobuđenim elektronima iz uzorka. Energije proizašlih elektrona iz uzorka skupljaju se i mjere specijalnim detektorima i uz pomoć mikroprocesora stvara se pseudotrodimensionalna slika i valnih duljina elektrona jedinstvena za element koji se nalazi uzorku.

SEM ima izrazitu prednost nad ostalim mikroskopima u području nekoliko osnovnih mjerenja i metoda. Jedna od najuvjerljivijih definitivno je rezolucija – sposobnost da se "vide" veoma mali objekti. Zatim, dubina polja – sposobnost da objekti različite "visine" na uzorkovnoj površini ostanu u fokusu, te mikroanaliza – sposobnost da se analizira sastav uzorka.

Svi SEM uređaji sastoje se od elektronske kolone koja stvara snop elektrona; komore za uzorke, gdje snop elektrona "pada" na uzorak; detektore koji promatraju varijabilnost signala koji dolaze od interakcije uzorka i snopa; sustava za gledanje koji pretvara signale u vidljivu sliku. Komora elektronskog topa u kojoj se stvara snop elektrona nalazi se na vrhu kolone. U njoj elektrostatsko polje usmjerava elektrone koji se emitiraju iz vrlo malog dijela površine elektrode, kroz mali otvor na Wehnelt-ovom cilindru. Nakon toga elektronski top ubrzava elektrone niz kolonu prema uzorku s energijama koje se kreću u rasponu od nekoliko stotina do nekoliko desetaka tisuća volti. Ima nekoliko vrsta elektronskih topova – wolfram, LaB6 (lantan heksaborid) i emisija kroz polje. Obje koriste različite materijale za elektrode i fizičke principe, ali zajedničko ime je stvaranje usmjerene zrake elektrona koja je stabilna, dovoljno snažna pri najmanjoj mogućoj površini. Elektroni se emitiraju iz elektronskog topa kao divergentna zraka. Skup magnetskih leća i otvora unutar kolone rekonvergiraju i fokusiraju snop u umanjenju sliku sjecišta zraka. Blizu samog dna kolone nalazi se set skenirajućih elektromagneta koji na specifičan način deflektiraju zraku prema zadnjoj leći, koja fokusira snop u što manju točku na površini uzorka.

Snop elektrona izlazi iz kolone u komoru s uzorcima. U komori se nalazi ploča (stage) koja omogućuje manipulaciju s uzorkom, vrata, odnosno ladica, koja je ujedno i hermetički zabrtvljena, a služi za umetanje i uklanjanje uzorka, ulazni konektori za umetanje raznih detektora signala i ostalih dodatnih uređaja. Kako elektroni iz snopa prodiru na uzorak, tako predaju energiju, koja se emitira iz uzorka na nekoliko načina. Svako emitiranje znači i potencijalni signal za detektore, koji iz njih mogu kreirati odgovarajuću sliku. [24] Shematski prikaz principa rada SEM-a kao i njegovi sastavni dijelovi dani su na slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz dijelova skenirajućeg elektronskog mikroskopa

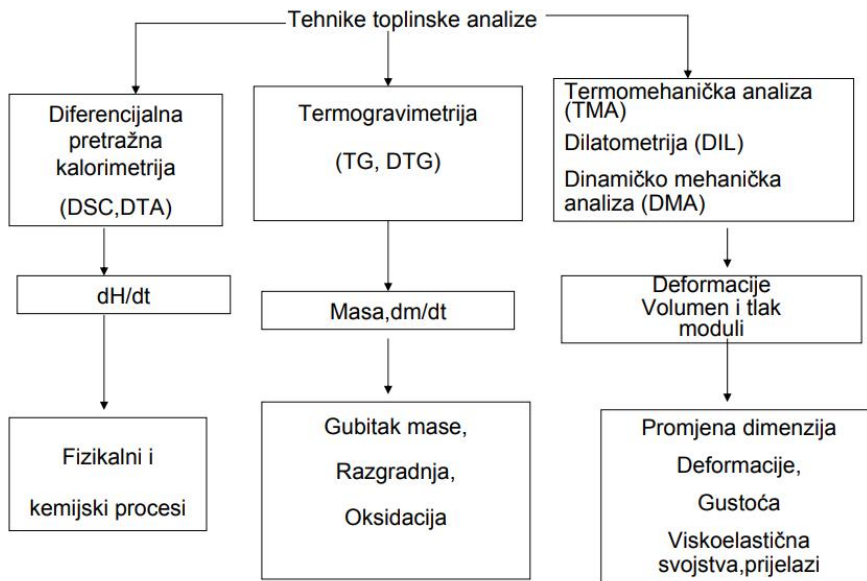
Različito od svjetlosti u optičkom mikroskopu, elektroni u SEM uređaju nikad neformiraju stvarnu sliku uzorka. Umjesto toga, SEM konstruira virtualnu sliku iz signala koji su emitirani iz uzorka. Uređaj radi na način da elektronskim snopom skenira liniju po liniju preko kvadratnog predloška na površini uzorka. Oblik predloška skeniranja definira površinu koja će biti prikazana na slici. U svakom trenutku procesa snop elektrona osvjetljava samo jednu točku na predlošku. Kako se snop elektrona pomiče od točke do točke, signali koji se stvaraju variraju snagom, reflektirajući na taj način različitosti u uzorku. Izlazni signal je stoga periodički tok podataka. Moderni uređaji imaju mogućnost digitalne obrade, odnosno pretvaranje analognih signala iz detektora u skup numeričkih vrijednosti, s kojima se naknadno može manipulirati na željeni način. Uobičajeno svi SEM uređaji koriste jednostavan prikaz slike temeljen na katodnoj cijevi (Cathode Ray Tube - CRT). CRT se sastoji od vakuumske cijevi koja na jednom kraju posjeduje fosforni premaz koji pobuđen elektronima emitira svjetlost, a na drugom kraju izvor elektrona i skup deflektirajućih elektromagneta. Slično kao u SEM uređaju, formira se snop

elektrona i ubrzava se prema fosforu. Skup elektromagneta skeniraju snop prema rasterskom predlošku, a fosforni premaz, pobuđen elektronima pretvara energiju elektrona u vidljivu svjetlost. Intenzitet svjetla ovisi o intenzitetu snopa elektrona u katodnoj cijevi. Usklađivanjem CRT skeniranja i SEM skeniranja te moduliranjem CRT elektronskog snopa sa signalom slike, sustav prikazuje točku na CRT, prikazujući sliku skenirane točke na površini uzorka. [24]

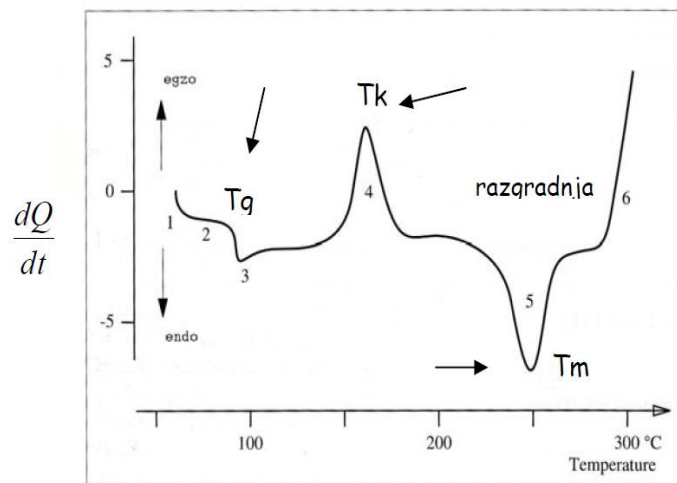
2.5. TEHNIKE TOPLINSKE ANALIZE

2.5.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Tehnike toplinske analize prate promjene nekog od svojstava materijala u ovisnosti o promjeni temperature. Pregled osnovnih tehnika toplinske analize dan je na slici 9, gdje je svaka tehnika definirana svojstvom materijala koje se prati tijekom mjerenja. Najčešće korištena tehnika toplinske analize je diferencijalna pretražna kalorimetrija, koja prati promjenu toplinskog toka s temperaturom, evidentira fazne transformacije u materijalu, nastale uslijed promjene specifičnog toplinskog toka ili egzotermnog odnosno endotermnog procesa. Metoda daje mogućnost kvantitativne i kvalitativne analize te je stoga češće korištena tehnika od diferencijalne toplinske analize (DTA). DSC tehnika osigurava precizno određivanje i temperatura transformacija i entalpija transformacija. Tehnika se može koristiti za karakterizaciju svih tipova materijala: polimera, metala, keramike, kompozita, stakla, itd. [14] Prednost pred ostalim tehnikama toplinske analize je u tome što je brza i jednostavna za izvedbu te se za mjerenje koristi vrlo mala masa uzorka (od 10 do 150 mg, ovisno o tipu materijala). Na slici 10. prikazane su osnovne transformacije: staklište, kristalište i talište.



Slika 9. Tehnike toplinske analize



Slika 10. Primjer DSC termograma

2.5.1. Termogravimetrija (TG)

Termogravimetrija je tehnika toplinske analize koja prati promjenu mase uzorka tijekom zagrijavanja, u kontroliranim uvjetima atmosfere. Ovom tehnikom omogućuje se određivanje toplinske stabilnosti materijala, udjela pojedinih komponenti, praćenje mehanizma razgradnje te temperaturnih intervala razgradnje.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I PRIPREMA UZORAKA

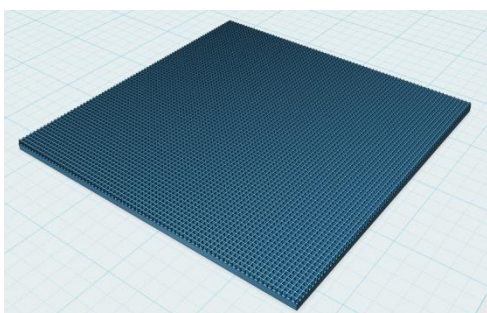
Ispitivanja su provedena na polikaprolaktonu (PCL), proizvođača ALDRICH Chemistry, molekulske mase u rasponu 70 000 – 90 000. Modificiranje površne polimernog nosača provedeno je titanijevim dioksidom (TiO₂), također proizvođača ALDRICH Chemistry, gustoće 3,9 gcm⁻³, u udjelima 0.5 %mas. i 1 % mas TiO₂. Polimerna otopina pripravljena je u mješavini otapala dimetilformamida i tetrahidrofurana u omjeru 1:1, a modifikacija titanijevim dioksidom provedena je sonifikacijom. Također su pripravljene otopine PCL s antibiotikom, Cefuroximom[®], proizvođača Astro Pharm, s aktivnom tvari cefuroxime sodium, u sastavima s 15 i 25%mas. CFU[®].

3.2. ELEKTROISPREDANJE NOSAČA

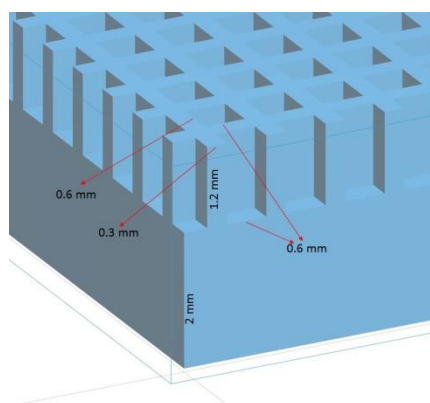
Elektroispredanje pripremljenih otopina PCL-a provedeno je na uređaju za elektroispredanje, NT-ESS-300, NTSEE Co. Ltd. South Korea (slika 12). Elektroispredanje je provedeno pri električnom naponu od 15 kV, uz brzinu izvlačenja vlakana od 1 ml/h, kroz 2 sata. Udaljenost kolektora od vrha igle iznosilo je 18 cm. Polimeri matovi taloženi su na 3D printane kolektore, prethodno dizajnirane programima 123 Design i Catia V5 te printanim na 3D printeru Form Labs, s dimenzijama danim u tablici 2. Pripremljeni su kolektori sa mrežastom i rebrastom geometrijom, a shematski prikaz dan je na slici 13. Na elektroispredene nosače nasadene su HeLa stanice, pripravljene u DMEM kulturi, inkubirane pri 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂ te je provedeno ispitivanje održivosti stanica MTT testom, 72 sata nakon nasadivanja.



Slika 12. Uređaj za elektroispredanje



a)



b)



c)

Slika 13. Dizajn kolektora: a) mrežasti kolektor, b) dimenzije mrežastog kolektora, c) rebrasti kolektor

Tablica 2. Dimenzije 3D printanih kolektora

3D printani kolektori	Kolektor 1 rebrasti [mm]	Kolektor 2 rebrasti [mm]	Kolektor 3 mrežasti [mm]	Kolektor 4 mrežasti [mm]
Visina	1.2 /0.6	1.2 /0.6	1.2	1.2
Debljina	0.3	0.3	0.3	0.3
Širina	0.6	1.0	0.6	1.0

3.3. KARAKTERIZACIJA NOSAČA

3.3.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Ispitivanja strukture nosača provedeno je na uređaju Infracrvenom spektrofotometru s Fourierovom transformacijom, ATR-FTIR, proizvođača Perkin Elmer (slika 14). Spektri su dobiveni u području frekvencija od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} , pri rezoluciji od 4 cm^{-1} .

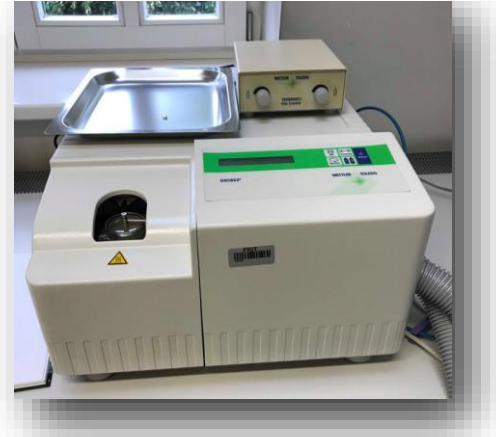


Slika 14. FTIR spektrofotometar, Perkin Elmer

3.3.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Toplinska svojstva čistog polikaprolaktona, modificiranih nosača s TiO_2 , kao i PCL/CFU[®] nosača, određena su na uređaju DSC analizator Mettler Toledo DSC 822^e (slika 15). Uzorci su ispitani u temperaturnom području od -100°C do 120°C , uz brzinu zagrijavanja/hlađenja od

10 °C/min, u atmosferi dušika. Provedna su 3 ciklusa mjerenja, a entalpije te temperature kristalizacije i tališta materijala određene su iz 2. ciklusa zagrijavanja/hlađenja.



Slika 15. Diferencijalni pretzračni kalorimetar, DSC 822^e, Mettler Toledo

3.3.3. Termogravimetrija (TG)

Termogravimetrijska analiza provedena je na uređaju TG A Q500, proizvođača TA Instruments (slika 16). Ispitivanja su provedena u temperaturnom području od sobne temperature do 700 °C, u inertnoj atmosferi.



Slika 16. Termogravimetar TG A Q500

3.3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

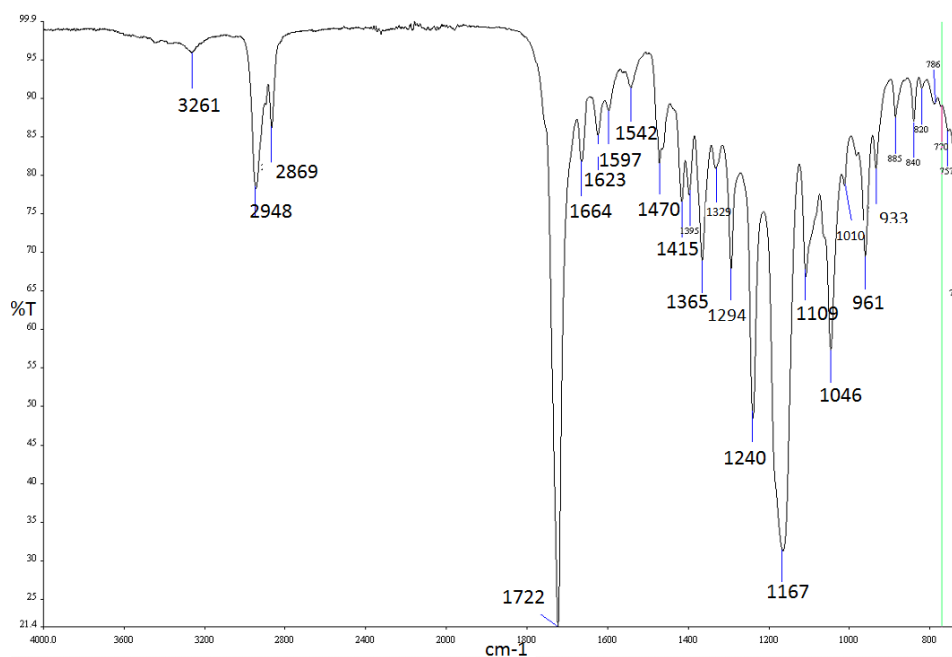
Morfološka ispitivanja uzoraka provedena su na skenirajućem elektronskom mikroskopu SEM FEG 250 QUANTA tvrtke FEI (slika 17), a dio uzoraka sniman je na uređaju Tescan Vega, pri 20 kV. Uzorci su prethodno fiksirani otopinama paraformaldehida (PFA) i PBS te dehidrirani smjesom etanola i heksametildisilizana. Prije snimanja uzorci su napareni zlatom radi provodljivosti.



Slika 17. SEM FEG 250 QUANTA tvrtke FEI u Ustanovi Centar za istraživanje materijala Istarske županije METRIS

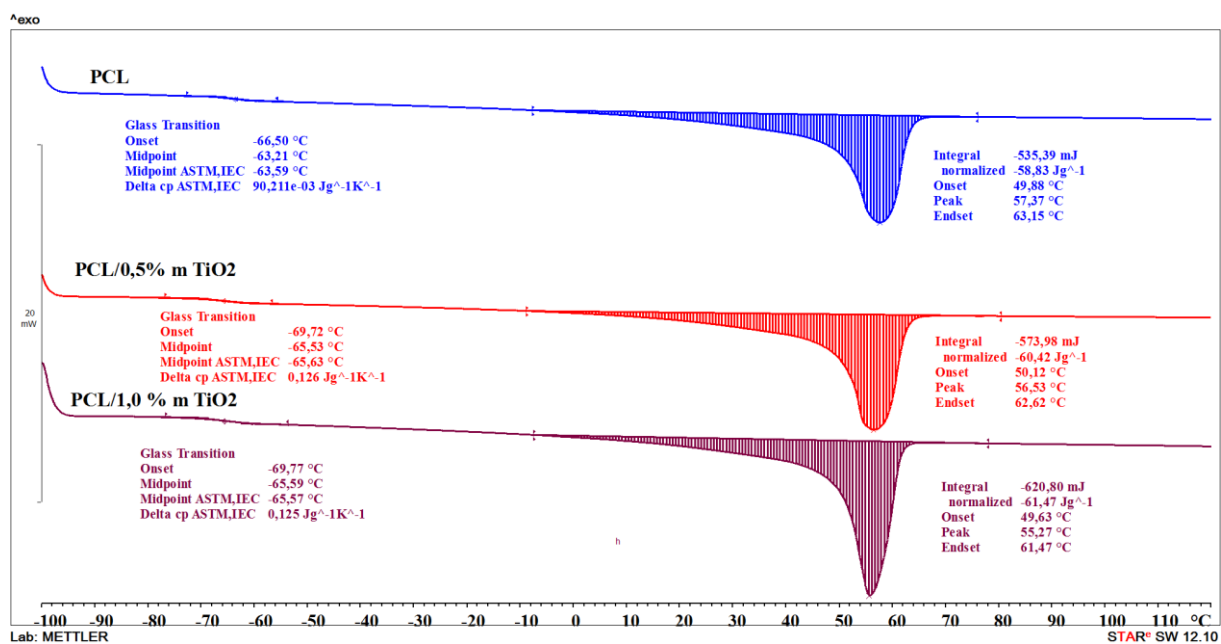
4. REZULTATI I RASPRAVA

ATR-FTIR analiza provedna je kako bi se ispitala uspješnost enkapsulacije lijeka u PCL nosač. FTIR spektar za nosač PCL sa 15 %mas. CFU[®] prikazan je na slici 18. Vide se karakteristični pikovi za PCL, na 2948 and 2869 cm^{-1} , povezani sa C-H vibracijama u $-\text{CH}_2$ i $-\text{CH}_3$. Na 1722 cm^{-1} nalazi se pik vezan uz karbonilnu grupu ($-\text{C}=\text{O}$), dok je pik na 1240 cm^{-1} vezan uz vibracije savijanja $-\text{C}=\text{O}$. Pikovi vezani uz antibiotik CFU[®] vidljivi su na: 1664, 1623, 1597 and 1542 cm^{-1} .

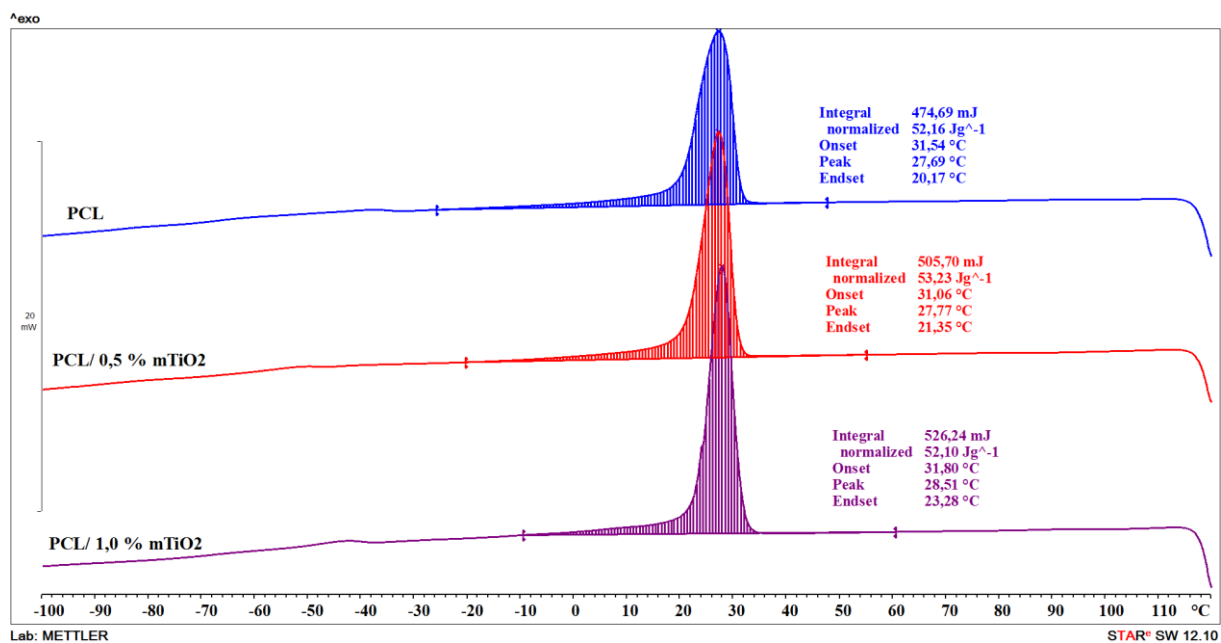


Slika 18. FTIR spektrogram za PCL/CFU[®] nosač

Rezultati ispitivanja diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom prikazani su na slikama 19 i 20. Ispitivanja su provedena u dva ciklusa zagrijavanja/hlađenja, a temperature transformacija su određene nakon 2. ciklusa, kako bi se zaboravila povijest pripreme materijala. DSC termogram za polikaprolakton, PCL, pokazuje da se radi o semikristaliničnom polimeru, s temperaturom staklišta pri $-63\text{ }^{\circ}\text{C}$. Temperatura taljenja određena je pri $57\text{ }^{\circ}\text{C}$, a kristalište pri temperaturi $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ (slika 19, tablica 3). Modificiranjem površine PCL nosača titanijevim dioksidom (TiO_2), dolazi do blagog sniženja temperature staklastog prijelaza. Temperatura taljenja se također blago snižuje, no porast entalpije taljenja ukazuje da TiO_2 djeluje kao nukleacijski agens za polikaprolakton. S povećanjem udjela titanijevog dioksida povećava se i toplina transformacije. Prema relaciji (1) određen je stupanj kristalnosti čistog PCL-a i modificiranih nosača, uzimajući u obzir entalpiju taljenja za 100 % kristalni polikaprolakton (tablica 3).



a)



b)

Slika 19. DSC krivulje za nosače PCL i PCL/TiO₂: a) krivulje zagrijavanja, b) krivulje hlađenja

$$\chi = \frac{\Delta H_p}{\Delta H_o} * 100\%$$

(1)

gdje je:

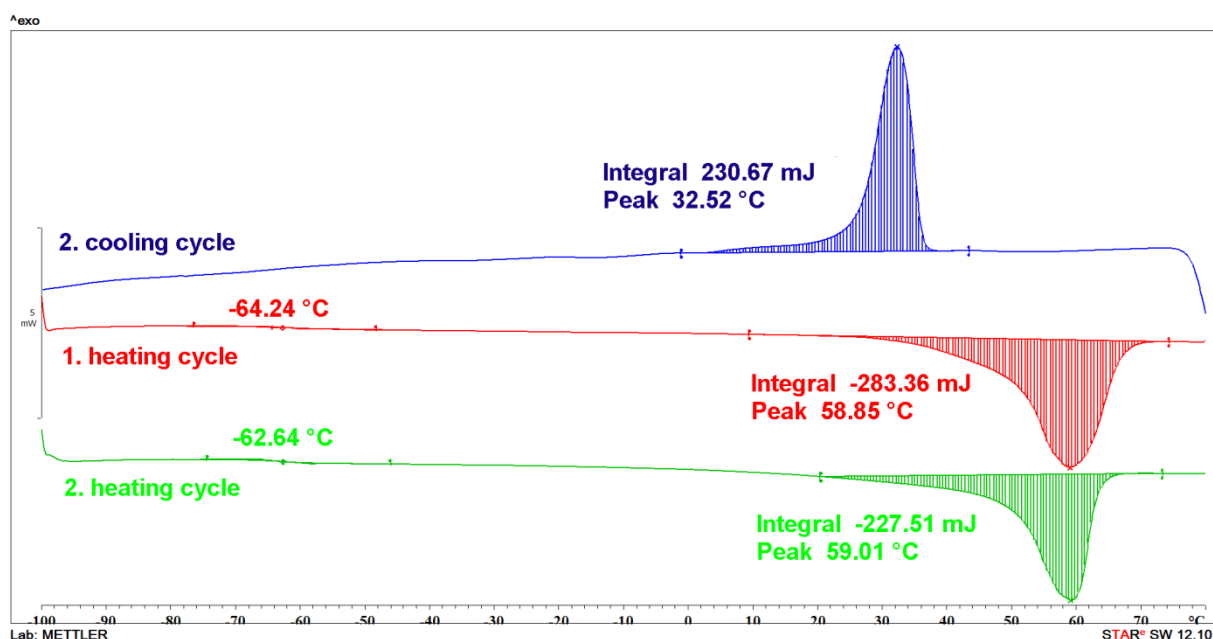
ΔH_p – parcijalna entalpija [J/g]

ΔH_o - entalpija taljenja za 100 % kristalinični PCL (142 J/g)

Može se vidjeti vrlo blagi porast kristalnosti PCL-a, ali istovremeno nema posebnih promjena temperatura kristalizacije (slika 19). Dodatkom lijeka u PCL temperatura kristalizacije i temperatura taljenja se pomiču na više vrijednosti (slika 20, tablica 3).

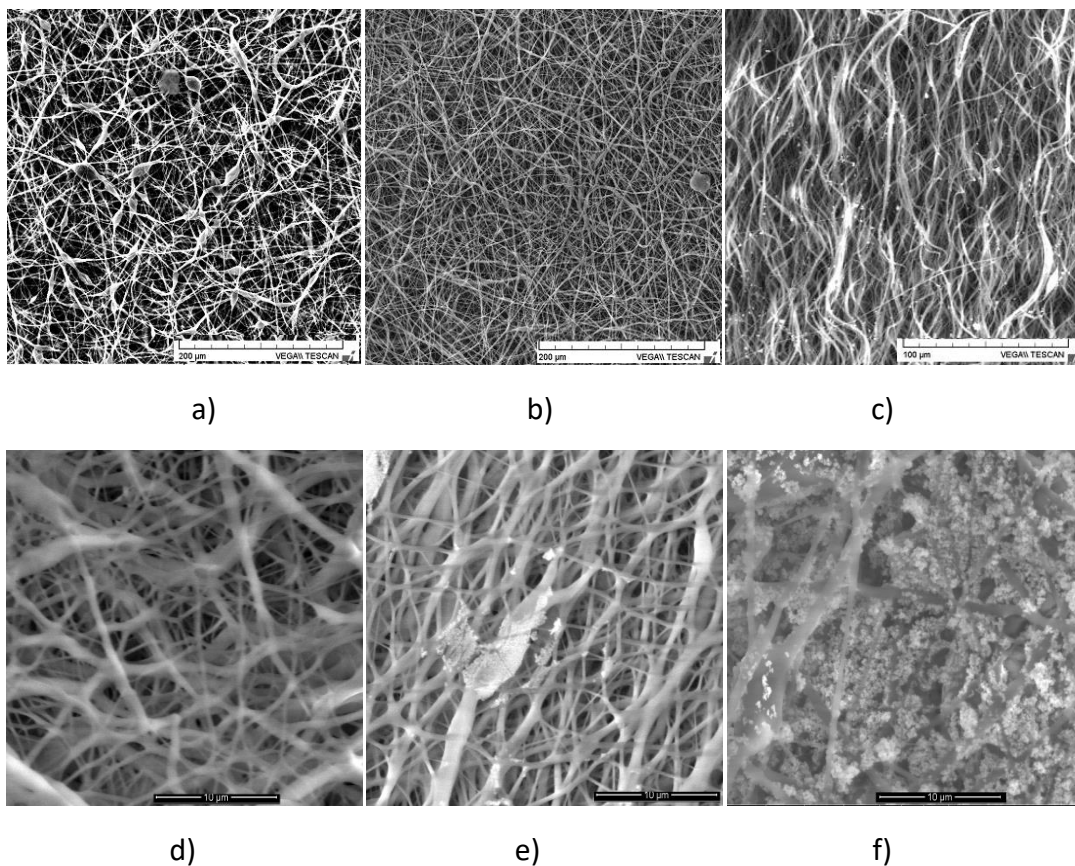
Tablica 3. Rezultati toplinske analize nosača

Uzorak	Temperatura taljenja, T_m [°C]	Temperatura kristalizacije, T_c [°C]	Entalpija taljenja, ΔH_m [J/g]	Entalpija kristalizacije, ΔH_c [J/g]	Stupanj kristalnosti, χ [%]
PCL	57.37	27.69	58.83	52.16	41.43
PCL/0.5%mas. TiO ₂	56.53	27.77	60.42	53.23	42.55
PCL/1%mas. TiO ₂	55.27	28.51	61.47	52.10	43.29
PCL/15%mas. CFU [®]	59.01	32.52	55.78	52.47	39.28



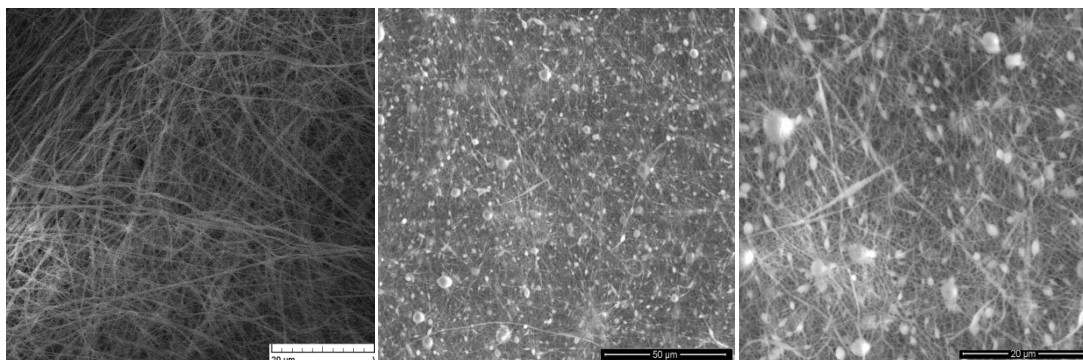
Slika 20. DSC termogram za PCL nosač s 15 % enkapsuliranog lijeka

Na slici 21. dane su mikrofotografije elektroispredenih nosača te orijentacije vlakana za čisti PCL i modificirani titanijevim dioksidom. Svi nosači pokazuju dobro pripremljenu poroznu strukturu mata, s različitim orijentacijama vlakana. Na slici vidi se da se u nosaču od čistog polikaprolaktona mjestimično stvaraju defekti u strukturi, što se vidi kao zadebljanje vlakana, što može biti posljedica neravnomjernog elektroispredanja uslijed viskoznosti otopine. SEM mikrofotografije nosača kod modificiranog PCL-a s TiO_2 , pokazuju ravnomjernija vlakna, ujednačenog promjera te pravilniju i kompaktniju mrežu. Kod veće koncentracije TiO_2 , može se vidjeti vrlo dobra raspodjela TiO_2 po površini vlakana, dok se pri manjoj koncentraciji javljaju aglomerati.



Slika 21. SEM mikrofotografije nosača: a) i d) PCL, b) i e) PCL/0.5%mas. TiO_2
c) i f) PCL/1%mas. TiO_2

Dodavanjem antibiotika u PCL nosač, pri manjoj koncentraciji Cefuroxima[®], 15 % mas., došlo je do formiranja vrlo dobre strukture, s jednoličnim vlaknima, dok je pri povećanju koncentracije lijeka na 25 % mas. došlo do stvaranja defekata u strukturi vlakana (slika 22). S obzirom da se 15 % mas. pokazalo kao optimalnija koncentracija, ona je odabrana za pripremu nosača na kolektorima različitih topografija, kako bi se istražio utjecaj geometrije na morfologiju nosača te razvoj stanica.



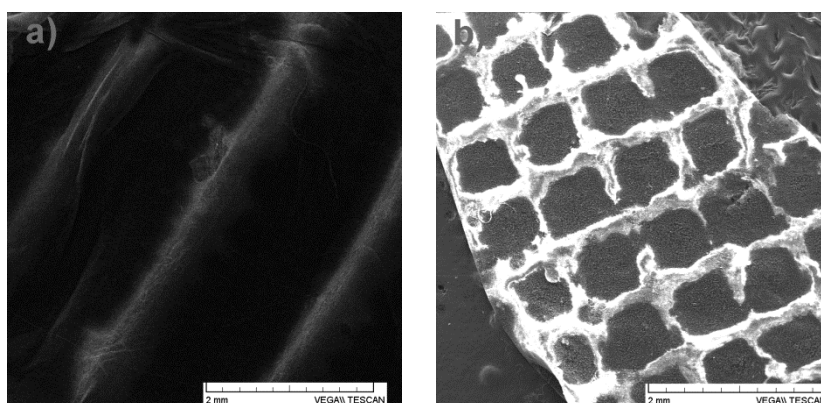
a)

b)

c)

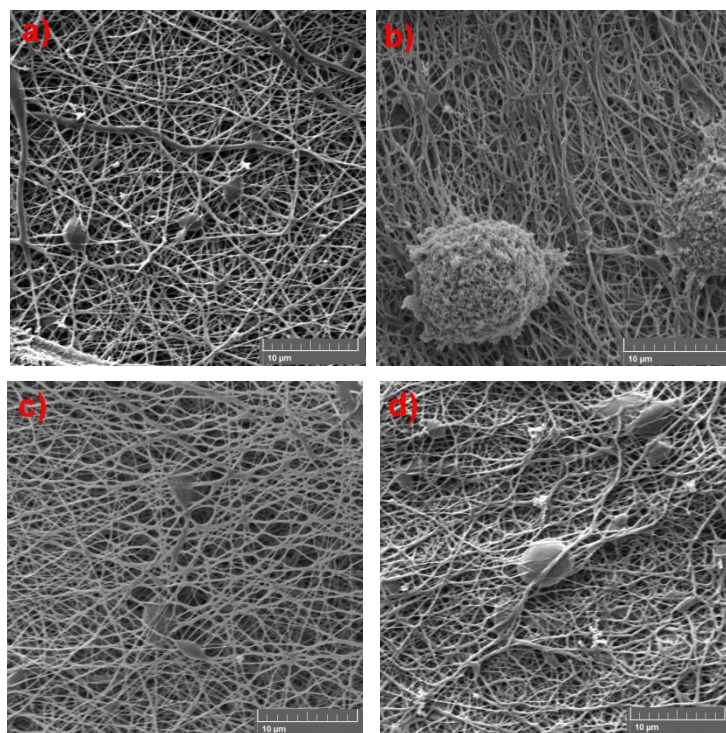
Slika 22. SEM mikrofotografije nosača: a) PCL/15%mas. CFU®,
b) i c) PCL/25%mas. CFU®

Polimerne otopine elektroispredane su te deponirane na 2 rebrasta i 2 mrežasta kolektora, dimenzija danih u tablici 2. Na slici 23. prikazana je osnovna topografija elektroispredanih matova na jednom rebrastom i jednom mrežastom kolektoru.

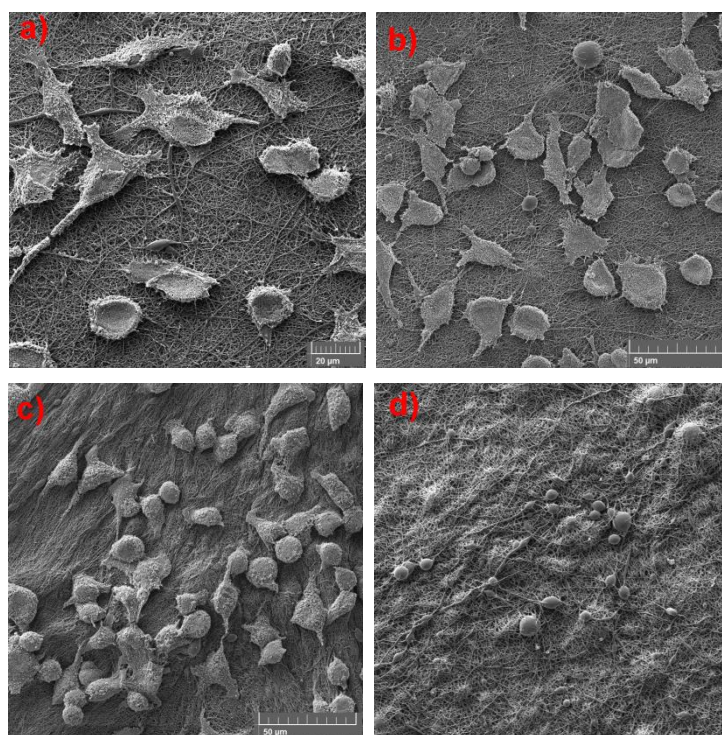


Slika 23. SEM mikrofotografije za nosače PCL/15wt% CFU® pripremljene na:
a) rebrastom kolektoru, b) mrežastom kolektoru; povećanje 46x

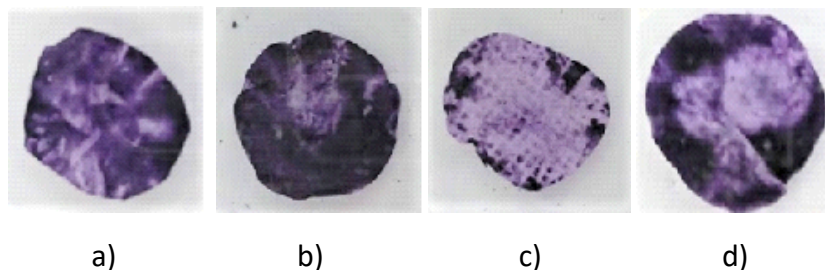
Usporedba svih dobivenih mreža prikazana je na slici 24. Može se vidjeti da kolektori 2 i 4 tvore kompaktnije mreže, s vlaknima nešto većeg promjera. Kod rebrastog kolektora 2, vlakna su orjentiranija u odnosu na mrežasti kolektor 4. Najfinija vlakna i najveća poroznost mreže dobivena je kod kolektora 3. Ispitivanje morfologije nakon nasađivanja stanica (slika 25) pokazalo je da je bolja adhezija stanica i razvoj na površini nosača ostvareno na kolektorima rebraste geometrije te su stanice poprimile spljošteni oblik. Kod mrežastih kolektora stanice još zadržavaju sferični oblik, uz lagano izduljenje. Najoptimalnija struktura nosača dobivena je na kolektoru 2, i prema morfolokoj analizi i prema ispitivanju MTT testom (slika 26).



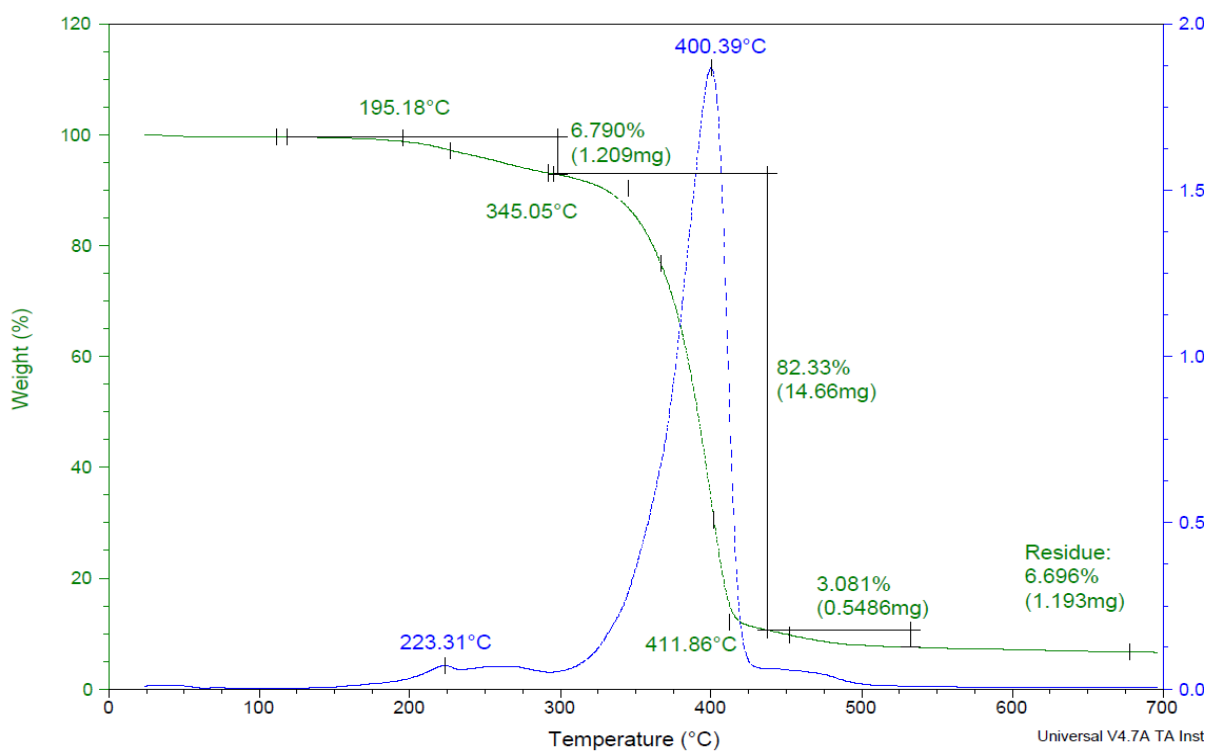
Slika 24. SEM mikrofotografije nosača PCL/15%mas. CFU[®] pripremljenih na : a) kolektor 1, b) kolektor 2, c) kolektor 3, d) kolektor 4



Slika 25. SEM mikrofotografije nosača PCL/15%mas. CFU[®] s nasađenim stanicama: a) kolektor 1, b) kolektor 2, c) kolektor 3, d) kolektor 4



Slika 26. HeLa stanice 72 sata nakon nasađivanja na PCL nosač: a) kolektor 1, b) kolektor 2, c) kolektor 3, d) kolektor 4



Slika 27. TG i DTG krivulje za nosač PCL/15 % mas. CFU[®]

Rezultati termogravimetrije pokazali su da toplinska razgradnja PCL/15 % mas. CFU[®] počinje pri temperaturi od 195°C te se dvija u tri stupnja (slika 27). Prvi interval razgradnje vezan je uz slučajno pucanje polimernog lanca, kroz cis-eliminaciju, nakon čega zatim dolazi do eliminacije monomera. Treći interval vezan je uz razgradnju lijeka. Na DTG krivulji vide se odgovarajući pikovi, pri temperaturama od 223 i 400 °C, koji su u korelaciji s infleksijom na TG krivulji. U svakom slučaju, nosač pokazuje zadovoljavajuću toplinsku stabilnost za područje primjene.

5. ZAKLJUČAK

Nosači polikaprolaktona za primjenu u tkivnom inženjerstvu uspješno su pripremljeni procesom elektroispredanja. Modifikacijom površine s TiO_2 , došlo je do laganog porasta kristalnosti materijala, ali nije bio značajnijih promjena temperatura transformacija. ATR-FTIR analiza dokazala je uspješnu enkapsulaciju lijeka u strukturu nosača, a 15 % mas. dodanog antibiotika CFU[®], pokazalo se optimalnije za elektroispredanje jednolične, porozne strukture mata, bez stvaranja defekata u strukturi vlakana, za razliku od 25 % mas. dodanog lijeka. Stoga je utjecaj topografije 3D printanih kolektora praćen samo za polimernu otopinu PCL/15 % mas. CFU[®]. Rezultati morfološke analize i MTT testa pokazali su da rebrasti kolektori pogoduju stvaranju arhitekture pogodne za adheziju stanica na nosač i difuziju stanica, osobito kolektor s većom širinom rebra (kolektor 2). Mrežasti kolektor, s najmanjom širinom rebra pokazao je stvaranje vrlo finih, tankih vlakana u mreži nosača, s velikom poroznosti između vlakana.

5. LITERATURA

- [1] Berthiaume F., Maquire T.J., Yarmush M.L., Tissue Engineering and Regenerative medicine:History, Progress and Challenges. *Annu.Rev.Biomol.Eng.* 2011;2:403-430.
- [2] Katari R., Peloso A., Orlando G., Tissue engineering and regenerative medicine: semantic considerations for an evolving paradigm. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2015;2;57:1-6.
- [3] Chen F.M., Liu X., Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.* 2016;1;53:86-168.
- [4] Badylak S.F., Nerem R.M., Progress in tissue engineering and regenerative medicine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2010;107;8:3285-3286.
- [5] Hasan M., Nayem K.A., Hossain B.M., Nahar S., Production of Tissue Engineering Scaffolds from Poly Caprolactone (PCL) and Its Microscopic Analysis. *International Journal of Textile Science.* 2014;3;3: 39-43.
- [6] Peričić M., Metode bioloških ispitivanja materijala pogodnih za umjetna tkiva, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
- [7] Harrison R.H., St-Pierre J.P., Stevens M.M., Tissue Engineering and Regenerative Medicine:A Year in Review. *Tissue Engineering-Part B.* 2014;20;1:1-16.
- [8] Tarun G., Ajay B., Bhawna K., Sunil K., Ravi S., Scaffold:Tissue Engineering and Regenerative medicine. *Int. Res. J. of Pharm. (IRJP).* 2011;2;12:37-42.
- [9] Bosworth L.A., Alam N., Wong J.K., Downes S., Investigation of 2D and 3D electrospun scaffolds intended for tendon repair. *J Mater Sci: Mater Med.* 2013; 24:1605–1614.
- [10]
- [11] Bolbasov E., Goreninskii S., Tverdokhlebov S., Mishanin A. et all, Comparative Study of the Physical, Topographical and Biological Properties of Electrospinning PCL, PLLA, their Blend and Copolymer Scaffolds.
- [12] Jun I., Han H.S., Edwards J.R., Jeon H., Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering:Viewpoints on Architecture and Fabrication. *International Journal of Molecular Science.* 2018;19;745:1-14.
- [13] Bai L., Li Q., Duo X., Hao X., Zhang W. et all., Electrospun PCL-PIBMD/SF blend scaffolds with plasmid complexes for endothelial cell proliferation. *RSC Adv.* 2017;7:39452–39464.
- [14] Kishan A.P., Cosgriff-Hernandez E.M., Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *Journal of Medical Materials Research A.*2017;105A;10:2892-2905.
- [15] Puljić D., Priprema PCL/nTiO₂ vlakana tehnikom elektroispredanja, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
- [16] Zhou Y., Chyu J., Zumwalt M., Recent Progress of Fabrication of Cell Scaffold by Electrospinning Technique for Articular Cartilage Tissue Engineering. *International Journal of Biomaterials.* 2018;ID1953636:1-10.
- [17] Cerkez I., Sezer A., Bhullar S.K., Fabrication and characterization of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibrous membrane with antibacterial functionality. *R. Soc. Open Sci.* 2017;4:160911; <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.c.3674065>.
- [18] Pelegrin I., Priprava anataasa sol-gel postupkom, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2011.
- [19] Bolla G. Rao, B.M. Reddy, Nanostructures for novel therapy 1st Edition. Print Book & E-Book. ISBN 9780323461429, 9780323461481.

- [20] Mirko Gojić: Površinska obrada materijala, Metalurški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Sisak, 2010.
- [21] Vanja Jug, Transmitacija sol-gel TiO₂ filmova, završni rad FSB, 2012.
- [22] University of Oslo Poul Norby Sol-Gel methodes
- [23] SRM University LECTURE 3 Sol – Gel method, Chemical Vapour Deposition, Physical Vapour Deposition
- [24] Gordan Mršić, Saša Žugaj: Analiza GSR čestica upotrebom elektronskog mikroskopa, Polic. sigur. (Zagreb), godina 16. (2007), broj 3-4, str. 179-200
- [25] Goldstein J. I., Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C., Lyman E., Lifshin E., Sawyer L., Michael J.R Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Springer Science + Business Media, , 2003, 274, 275.