TEDI International Interdisciplinary Journal of Young Scientists from the Faculty of Textile Technology

Medicinska pomagala od elektroispredenih nanovlakana

Korina Žaja

SAŽETAK
Medicinska pomagala od elektroispredenih nanovlakana predstavljaju inovativnu primjenu nanotehnologije u biomedicinskoj industriji. Elektroispredanje je napredna tehnika koja omogućava proizvodnju nanovlakana iz različitih polimernih materijala korištenjem električnog polja, što rezultira izuzetno tankim vlaknima koja imaju promjer u opsegu nanometara. U procesu sinteze nanovlakana tehnikom elektroispredanja, mnogi čimbenici utječu na svojstva sintetičkih nanovlakana kao što su: svojstva polimera, svojstva otapala, aditivi, koncentracija polimera, svojstva otopine i tako dalje.
U ovom radu se tehnika elektroispredanja provodila s otopinom polikaprolaktona (PCL) u smjesi otapala diklormetan i dimetilformamid (DMF). PCL je sintetički biopolimer koji se široko koristi u biomedicinskim i industrijskim aplikacijama zbog svojih odličnih svojstava, kao što su biokompatibilnost, biorazgradljivost i lakoća obrade. To je alifatski poliester koji se dobiva polimerizacijom kaprolaktona, monomera koji se sastoji od šest ugljikovih atoma. Zbog svojih karakteristika, PCL je posebno pogodan za upotrebu u biomedicinskim materijalima i sustavima za otpuštanje lijekova.
Rezultati ovog istraživanja dokazali su kako je moguće tehnikom elektroispredanja dobiti nanovlakna pod određenim uvjetima napona, koncentracije polimera, brzine istiskivanja polimerne otopine te udaljenosti između elektroda. Dokazana je i mogućnost implementacije indometacina u dobiveni uzorak.

Ključne riječi: medicinska pomagala, elektroispredanje nanovlakana, polimeri, polikaprolakton, indometacin

ABSTRACT
Medical devices made from electrospun nanofibers represent an innovative application of nanotechnology in the biomedical industry. Electrospinning is an advanced technique that allows the production of nanofibers from various polymeric materials using an electric field, resulting in exceptionally thin fibers with diameters in the nanometer range. In the process of synthesizing nanofibers using the electrospinning technique, many factors influence the properties of the synthesized nanofibers, such as polymer properties, solvent properties, additives, polymer concentration, and solution characteristics.
In this study, the electrospinning technique was conducted with a solution of polycaprolactone (PCL) in a solvent mixture of dichloromethane and dimethylformamide (DMF). PCL is a synthetic biopolymer widely used in biomedical and industrial applications due to its excellent properties, such as biocompatibility, biodegradability, and ease of processing. It is an aliphatic polyester obtained by the polymerization of caprolactone, a monomer consisting of six carbon atoms. Due to its characteristics, PCL is particularly suitable for use in biomedical materials and drug delivery systems.
The results of this research have demonstrated that it is possible to obtain nanofibers using the electrospinning technique under specific conditions, such as voltage, polymer concentration, extrusion rate of the polymer solution, and distance between the electrodes. The possibility of incorporating indomethacin into the obtained sample has also been confirmed.

1. UVOD

Medicinska pomagala od elektroispredenih nanovlakana predstavljaju inovativno i uzbudljivo područje u modernoj medicini i biotehnologiji. Ova napredna tehnologija omogućava proizvodnju izuzetno tankih i laganih vlakana koja posjeduju impresivne fizičke i biološke osobine, kao što su visoka površinska napetost, poroznost i mogućnost integracije s biološkim tkivima. Elektroispredanje, proces kojim se ova vlakna proizvode, omogućava precizno kontroliranje njihovih karakteristika, kao što su promjer vlakana, struktura i poroznost, što je ključno za njihovu primjenu u medicinskim pomagalima.
Nanovlakna koja se dobivaju ovom metodom mogu se koristiti u širokom spektru medicinskih aplikacija, uključujući rane, regeneraciju tkiva, isporuku lijekova, izradu implantata, te kao sastavni dio različitih bioaktivnih materijala. Zbog shoji

jedinstvenih osobina, elektroispredena nanovlakna pružaju mogućnost razvoja sofisticiranih terapijskih sistema i pomagala koja su efikasnija i prilagodljivija potrebama pacijenata, čime se otvara novi horizont za buduće medicinske tretmane.
Spomenuta tehnologija se sve više koristi u biomedicini zbog sposobnosti nanovlakana da imitiraju prirodne strukture, kao što su vanstanični matriks i tkiva. Medicinska pomagala od elektroispredenih nanovlakana imaju velik potencijal u inženjerstvu materijala, oblozima za rane i sustavima za kontrolirano otpuštanje lijekova.
Ova vlakna imaju specifična svojstva, poput velike površinske napetosti, visoke poroznosti, mehaničke fleksibilnosti i biokompatibilnosti, što ih čini izuzetno pogodnim za upotrebu u medicinske svrhe. Međutim, i dalje postoji potreba za istraživanjima u cilju optimizacije ovih materijala za specifične medicinske potrebe.
Cilj ovog rada je optimizacijom parametara kao što su napon, koncentracija polimera, brzina napredovanja vlakana te udaljenost između elektroda doći do uspješno formiranog uzorka pređe dobivenog tehnikom elektroispredanja, kao i implementacija indometacina u dobiveni uzorak. Također provođenje karakterizacije pomoću analiza dobivenih vlakana kako bi se utvrdili površinska morfologija i mehanička svojstva.

2. OPĆI DIO

2.1. Elektroispredanje

Elektroispredanje predstavlja široko priznat postupak za proizvodnju jednostavnih konstrukcija sastavljenih od mikro i nanovlakana. Ovaj proces prvi je predložio Anton Formhals još 1930-ih godina. Od tada je našao primjenu u različitim industrijskim granama, uključujući zrakoplovstvo, svemirsku i tekstilnu industriju, filtraciju te poljoprivredu.[1]

Sam proces elektroispredanja temelji se na korištenju električnog polja za stvaranje vlakana čija veličina varira od mikrometara do nanometara. Ključni elementi ovog postupka uključuju mlaznicu povezanu s izvorom visokonaponske istosmjerne struje, uređaj za kontrolu protoka i uzemljeni kolektor.[2]

Kada se električno polje primijeni između mlaznice i kolektora, na vrhu mlaznice formira se mikro sfera. Kako električna sila raste, mikro sfera se izdužuje u obliku stošca, poznatog kao Taylorov stožac. Čim elektrostatska sila unutar stošca postane jača od površinske napetosti, dolazi do stvaranja mlaza tekućine. Taj mlaz podložan je nestabilnostima savijanja, što uzrokuje raspršivanje vlakana, koja se zatim nasumično orijentiraju u vlaknastu prostirku.[3]

Takva mikro i nanovlakna posjeduju veliki omjer površine u odnosu na volumen, što značajno doprinosi staničnim aktivnostima, uključujući prianjanje, rast i diferencijaciju stanica.[4] Dodatno, elektroispredene konstrukcije uspješno oponašaju strukturu ekstracelularne matrice, koja ima ključnu ulogu u mnogim staničnim procesima, kao što su preživljavanje, polaritet, migracija i diferencijacija.[5] Ekstracelularna matrica također ima važnu funkciju u interakcijama između stanica i matrice, omogućujući prijenos vanjskih signala u intracelularne procese.[6]

Elektroispredanje kao svestrana, jednostavna i isplativa metoda uvelike je pridonijela razvoju u biomedicinskom polju. Međutim, tradicionalno elektroispredanje samo jednog materijala može proizvesti homogene vlaknaste snopove s ograničenim funkcionalnim svojstvima, što često ne uspijeva zadovoljiti sve veće zahtjeve biomedicinskih primjena i pratiti njihove stalno rastuće trendove. Stoga je nedavno razvijeno višematerijalno elektroispredanje koje se odnosi na primjenu dviju ili više vrsta materijala kako bi se omogućila proizvodnja raznovrsnih složenih vlaknastih struktura s naprednim performansama za značajno promicanje biomedicinskog razvoja.[7]

2.1.1. Polimeri kod elektroispredanja

Posljednjih desetak godina intenzivno se proučava elektroispredanje polimera jer omogućuje sintetiziranje vlakana iz različitih vrsta polimera kao što su sintetski polimeri, prirodni polimeri ili pak mješavina obiju vrsta polimera, što nazivamo kopolimer. Prirodni polimeri u usporedbi sa sintetskim polimerima obično pokazuju nižu imunogenost i bolju biokompatibilnost kada se radi o biomedicinskim primjenama.[8]

Tipični prirodni polimeri koji obećavaju bolju kliničku funkcionalnost i koriste se za elektroispredanje uključuju; želatinu, celulozu, hitin, svilu i vunu.[9]

Želatina, dobivena hidrolizom kolagena, nudi izvrsnu biokompatibilnost i često se primjenjuje u tkivnom inženjerstvu.[10] Celuloza i njezini derivati osiguravaju mehaničku stabilnost te regulaciju propusnosti, dok hitin i njegov derivat hitozan imaju antimikrobna svojstva i potiču regeneraciju tkiva.[11] Svilena fibroin vlakna prepoznata su po visokoj čvrstoći, elastičnosti i mogućnosti kontroliranog otpuštanja bioaktivnih tvari. Vuna, bogata keratinom, koristi se zbog svoje sposobnosti vezanja vlage i poticanja adhezije stanica.[12] Zajedničko obilježje ovih polimera jest mogućnost oblikovanja u nanovlaknene matrice koje imitiraju izvan-stanični matriks, čime se otvara prostor za njihovu širu kliničku primjenu, iako su različitog kemijskog sastava.[10-12]

Želatina je denaturirani oblik kolagena, glavnog strukturnog proteina u životinjskom tkivu. Njezina najveća prednost leži u biokompatibilnosti i biodegradabilnosti, što je čini izvrsnim materijalom za kontakt sa stanicama i tkivima. Osim toga,

želatina je bogata bioaktivnim sekvencama aminokiselina koje potiču adheziju i proliferaciju stanica, što je posebno važno u regeneraciji tkiva.[10]

Kod elektroispredanja želatina pokazuje određene izazove, jer u prirodnom obliku nema dovoljno dobre mehaničke stabilnosti. Zbog toga se često kombinira sa sintetskim polimerima, poput polikaprolaktona ili polietilen-oksida, kako bi se poboljšala čvrstoća i otpornost dobivenih vlakana.[13] Također, želatina se može kemijski unakrsno umrežavati, čime se stabilizira u vodenim uvjetima i produžava vrijeme razgradnje.[13,14] U biomedicini se elektroispredena želatina koristi za izradu nosača za stanice (eng. *scaffold*), sustava za kontrolirano otpuštanje lijekova i bioaktivnih obloga za rane.[10,14]

Celuloza je najzastupljeniji prirodni polimer na Zemlji i osnovna komponenta biljne stanične stijenke. Ona je linearni polisaharid građen od β-D-glukoznih jedinica povezanih β(1→4) glikozidnim vezama. Karakterizira ju visoka mehanička čvrstoća, stabilnost i netoksičnostst.[15] Derivati celuloze (npr. karboksimetilceluloza, acetilceluloza) često koriste jer su lakše topivi i pogodniji za elektroispredanje.[16] Prednost celuloze i njezinih derivata jest mogućnost regulacije poroznosti i propusnosti vlakana, što omogućuje primjenu u membranama za filtraciju, ali i u medicinske svrhe, poput sustava za kontrolirano otpuštanje lijekova ili potpornih matrica za rast stanica.[16,17] Dodatno, celuloza je otporna na enzime ljudi i životinja, pa je u nekim primjenama potrebno modificirati ju kako bi bila razgradiva ili kompatibilna s biološkim sustavima.[15,17]

Hitin je drugi najzastupljeniji prirodni polisaharid nakon celuloze, a nalazi se u egzoskeletima rakova, kukaca i u staničnim stijenkama gljiva.[18] Njegov deacetilirani oblik, hitozan, znatno je važniji za biomedicinsku primjenu zbog topivosti u vodenim otopinama i izrazite bioaktivnosti.[19]

Hitozan posjeduje antimikrobna svojstva, što ga čini posebno pogodnim za izradu obloga za rane i antimikrobnih premaza.[20] Osim toga, hitozan može poticati zgrušavanje krvi i regeneraciju tkiva, pa je idealan materijal za sustave namijenjene zacjeljivanju rana.[21] Kod elektroispredanja, hitozan se često kombinira s drugim polimerima jer samostalno može pokazivati ograničene mehaničke karakteristike. Kombinacijom s polilaktidom ili polikaprolaktonom dobiva se balans biokompatibilnosti i mehaničke stabilnosti.[22]

Svila/ svileni fibroin, protein je dobiven iz kukuljica dudovog svilca (lat. *Bombyx mori*), te je od najistraženijih prirodnih polimera u kontekstu elektroispredanja. Svila je poznata po svojoj iznimnoj čvrstoći i elastičnosti, a ujedno je i biokompatibilna i razgradiva.[23] Struktura fibroina omogućuje kontrolu mehaničkih svojstava vlakana, a dodatna prednost je mogućnost funkcionalizacije površine vlakana s bioaktivnim molekulama. Elektroispredana svila pokazala se vrlo pogodnom za izradu scaffolda u inženjerstvu tkiva, osobito za kožu, hrskavicu i živčano tkivo.[24] Njena otpornost i mogućnost sporog otpuštanja ugrađenih lijekova ili faktora rasta dodatno povećavaju potencijal primjene u regenerativnoj medicine.[25]

Vuna je izuzetno bogata keratinom, prirodnim proteinom sa značajnim udjelom sumpornih aminokiselina, pa se stoga također istražuje u kontekstu elektroispredanja.[26] Keratin potiče adheziju i proliferaciju stanica, dok vlakna vune imaju sposobnost zadržavanja vlage, što je korisno u oblogama za rane i kozmetičkim primjenama.[27] Jedan od izazova kod elektroispredanja keratina iz vune jest postizanje stabilnih otopina, jer se keratin često mora prethodno otopiti ili modificirati. Kombiniranjem s drugim polimerima poboljšavaju se mehanička svojstva i procesibilnost.[26,28] Vuna se sve više istražuje kao održiva alternativa sintetskim biomaterijalima, upravo zbog svoje prirodne dostupnosti i biokompatibilnosti.[28]

Prirodni polimeri imaju razne prednosti; ekološki su prihvatljivi, netoksični, biorazgradivi, a neki čak pružaju i antibakterijsko djelovanje. Unatoč svim navedenim prednostima, loša mehanička i toplinska svojstva uvelike ograničavaju njihovu primjenu.[29]

Također, kao nedostaci korištenja prirodnih polimera u svrhu elektroispredanja mogu se navesti još i djelomična denaturacija i problem proizvodnje nekih prirodnih polimera.[9]

Sintetski polimeri imaju nekoliko prednosti u odnosu na prirodne polimere. Pružaju mogućnost dizajniranja po potrebi tj. uvođenje potrebnih karakteristika ovisno o svrsi uporabe, kao što su željena stopa razgradnje, potrebna viskoelastičnost i čvrstoća. Nadalje, neki nedostaci korištenja sintetskih polimera za elektroispredanje su: duga biorazgradnja i niska biokompatibilnost nekih sintetskih polimera. U najčešće korištene sintetske polimere za elektroispredanje spadaju: poliglikolid, polikaprolakton, polilaktid, poliuretan, polistiren i polivinil alkohol.[9]

Sintetski polimeri zauzimaju stoga iznimno važno mjesto u suvremenim istraživanjima i primjeni elektroispredanja jer nude fleksibilnost u dizajnu materijala, kontrolu nad fizičkim, kemijskim i biološkim svojstvima te mogućnost dobivanja vlakana točno definiranih karakteristika.[8] Za razliku od prirodnih polimera, koji često pate od problema varijabilnosti i složenosti ekstrakcije, sintetski polimeri mogu se sintetizirati u velikim količinama uz reproducibilna svojstva, što ih čini poželjnim za industrijsku proizvodnju i translaciju u kliničku praksu.[30]

Međutim, jedan od glavnih izazova je njihova ponekad nedovoljna biokompatibilnost ili spora razgradnja, pa se često kombiniraju s prirodnim polimerima ili se kemijski modificiraju kako bi se poboljšala njihova primjenjivost u biomedicinskom području.[30,31] U kontekstu elektroispredanja posebno se ističu poliglikolid (PGA), polikaprolakton (PCL), polilaktid (PLA), poliuretan (PU), polistiren (PS) i polivinil alkohol (PVA), a njihova svojstva, prednosti i nedostaci detaljno se razmatraju u nastavku.[31]

Poliglikolid (PGA) jedan je od prvih i najvažnijih sintetskih biorazgradivih poliestera, široko primjenjivan u biomedicini, osobito za resorptivne kirurške konce i implantabilne materijale.[32] Riječ je o visoko kristaliničnom polimeru (45–55 %), što mu daje dobra mehanička svojstva poput visoke čvrstoće na vlak, ali i krhkost te nižu žilavost.[33]

PGA se razgrađuje hidrolitičkom degradacijom esterskih veza u glikolnu kiselinu, koja se dalje uključuje u prirodne metaboličke puteve i eliminira iz organizma, pri čemu potpuna razgradnja može nastupiti unutar nekoliko tjedana do mjeseci.[32,33] Zbog relativno brze degradacije koristi se u privremenim aplikacijama, poput šavova. U elektroispredanju formira stabilna vlakna, ali visoka kristaliničnost otežava postizanje ujednačenih nanostruktura, pa se često kombinira s PLA ili PCL radi poboljšanja obradivosti i mehaničkih svojstava.[34]

Polikaprolakton (PCL) poliesterski je polimer poznat po izvrsnoj obradivosti, fleksibilnosti i niskoj temperaturi taljenja (oko 60 °C). Zbog polukristalinične strukture razgrađuje se sporo u fiziološkim uvjetima, što omogućuje dugotrajnu mehaničku stabilnost, ali može biti i nedostatak kada je potrebna brža resorpcija.[35]

PCL je biokompatibilan i našao je široku primjenu u ortopedskim implantatima, sustavima za kontrolirano otpuštanje lijekova i tkivnom inženjerstvu.[35,36] Pogodan je za elektroispredanje jer je dobro topiv u organskim otapalima, a dobivena vlakna su fleksibilna i stabilna. Često se kombinira s hidrofilnim polimerima radi poboljšanja adhezije i proliferacije stanica.[36,37]

Polilaktid (PLA) biorazgradivi je poliester dobiven polimerizacijom mliječne kiseline i jedan je od najčešće korištenih biomaterijala.[38] Postoji u različitim stereoizomernim oblicima (PLLA, PDLA, PDLLA), pri čemu stereoizomerija značajno utječe na kristalinitet i mehanička svojstva.[39]

PLA je biokompatibilan i razgrađuje se u mliječnu kiselinu, koja se dalje metabolički razgrađuje u organizmu. Vrijeme razgradnje varira od nekoliko mjeseci do nekoliko godina, ovisno o stupnju kristaliniteta i uvjetima okoline.[38,39] Pogodan je za elektroispredanje, a zbog kombinacije dobrih mehaničkih svojstava i mogućnosti kontrole degradacije često se koristi samostalno ili u kombinaciji s PCL-om u sustavima za kontrolirano otpuštanje lijekova i u tkivnom inženjerstvu.[31]

Poliuretani (PU) predstavljaju raznoliku skupinu polimera dobivenih reakcijom izocijanata s poliolima, a njihova svojstva ovise o udjelu mekih i tvrdih segmenata u makromolekuli.[40] Pravilnim odabirom monomera mogu se postići materijali visoke mehaničke otpornosti ili elastični i fleksibilni poput gume.

Za biomedicinsku primjenu najčešće se koriste PU sintetizirani od biokompatibilnih poliola i alifatskih izocijanata, što osigurava nisku citotoksičnost i dobru kompatibilnost s tkivom.[41] PU materijali odlikuju se fleksibilnošću, otpornošću na habanje i kontroliranom razgradnjom, a u elektroispredanju lako formiraju homogena i elastična vlakna pogodna za primjenu u inženjerstvu mekih tkiva poput kože, krvnih žila i ligamenata.[41,42]

2.1.2. Otapala kod elektroispredanja

Svojstva otopine su također bitan parametar u procesu elektroispredanja koja se koriste u svrhu kontrole raznih karakteristika vlakana poput promjera i morfologije. Međutim, ovo je jedan od najmanje istraženih parametara u konstrukciji nanovlaknastih sklopova. Osim električnog polja, također je važno razmotriti kako svojstva otopine i materijala mogu utjecati na proizvodnju nekih složenijih nanostruktura. Poznato je kako korištenje otapala, polimera i/ili aditiva s većom električnom vodljivošću neizbježno utječe na nestabilnost savijanja elektroispredenog mlaza.[43]

Otapanje polimera u prikladnom otapalu početni je korak u procesu elektroispredanja. Otapala moraju imati dobra vrelišta, hlapljivost, tlak pare i druga svojstva te moraju održavati cjelovitost otopine polimera.[8] Vrelište, topljivost polimera i dielektrična konstanta otapala čimbenici su koji utječu na izbor otapala koje se koristi u elektroispredanju. Tijekom procesa, otapalo hlapi dok mlaz fluida putuje prema kolektoru.[44] Pojedinačna vlakna će se formirati tek kada većina otapala ispari. Što znači da je nemoguće formirati vlakna ili pak istaložiti tanki film otopine polimera na kolektoru ako većina otapala ne ishlapi.[45]

Većina polimera koji se koriste u procesu elektroispredanja su netopivi u vodenim otopinama. Stoga je upotreba organskih otapala gotovo nužna kako bi se omogućila potpuna ekspanzija polimera u otopini i proizvela suha razdvojena vlakna tj. kako bi sam proces bio izvediv.[46]

Što se tiče opasnosti pri masovnoj proizvodnji tijekom elektroispredanja, brzo nakupljanje para otapala u okolišu predstavlja opasnost od požara i također može utjecati na sušenje vlakana. Komora u kojoj se izvodi proces mora biti pravilno ventilirana i bez mogućih smetnji koje mogu utjecati na izvedbu. Također bi trebalo razmotriti čišćenje i recikliranje otapala iz otopine.[47]

Najčešća otapala koja se koriste za sintezu elektroispredenih nanovlakana su: akrilna kiselina, kloroform, diklorometan (DCM), tetrahidrofuran (THF), dimetilformamid (DMF) i heksafluoroizopropanol (HFIP).[46]

Akrilna kiselina (AA) (CH_2=CH–COOH) je monomer s karboksilnom skupinom (–COOH) koja omogućuje formiranje vodikovih veza i interakcija s polimernim matricama.[48] U elektroispredanju se najčešće koristi kao aditiv ili komonomer jer samostalno nema dovoljnu volatilnost za stabilno formiranje vlakana. Dodavanje AA u polimerne otopine, poput poli(vinil alkohola) ili želatine, povećava hidrofilnost i uvodi funkcionalne skupine u nanovlakna, čime se poboljšava njihova biokompatibilnost i sposobnost vezanja biomolekula. Takva vlakna pokazuju velik potencijal u tkivnom inženjerstvu i sustavima za kontrolirano otpuštanje lijekova.[49,50]

Kloroform ($CHCl_3$) jedno je od najčešće korištenih otapala u elektroispredanju jer učinkovito otapa hidrofobne polimere poput PCL-a, PLA-a i PS-a.[51] Zbog umjerene hlapljivosti i niske točke vrelišta (61 °C), omogućuje brzo isparavanje tijekom procesa i formiranje homogenih vlakana. Često se kombinira s otapalima poput dimetilformamida (DMF), čime se

poboljšava viskoznost otopine i postiže kontrola morfologije vlakana.[52] Unatoč izvrsnim reološkim svojstvima i „zlatnom standardu" u elektroispredanju PLA i PCL vlakana, glavni nedostatak kloroforma je visoka toksičnost i kancerogeni potencijal, pa njegova uporaba zahtijeva stroge mjere zaštite.[53]

Diklorometan (DCM) vrlo je često otapalo u elektroispredanju zbog niske točke vrelišta (39,6 °C) i sposobnosti otapanja brojnih polimera poput PCL-a, PLA-a i poliuretana.[51] Brzo isparavanje omogućuje sušenje vlakana, ali može dovesti do poroznih ili krhkih struktura, pa se DCM u praksi često kombinira s dimetilformamidom (DMF) radi postizanja stabilnog mlaza i glatkih vlakana.[54]

Smjese DCM/DMF, osobito u omjeru 9:1, pokazuju odlične rezultate pri elektroispredanju PLA i PCL vlakana.[53,54] DCM se koristi i za pripremu vlakana s inkorporiranim bioaktivnim molekulama jer brzo isparavanje „zarobljava" molekule unutar strukture, no zbog toksičnosti i potencijalne kancerogenosti zahtijeva pažljivu primjenu.[51,53]

Tetrahidrofuran (THF) ciklički je eter i polarno aprotonsko otapalo koje otapa širok raspon polimera, uključujući PLA, PCL, PU i PS.[55] Umjerena hlapljivost (b.p. 66 °C) pogoduje formiranju ravnomjernih vlakana, dok se u praksi često kombinira s DMF-om radi poboljšanja vodljivosti.[56]

THF omogućuje dobru kontrolu debljine vlakana i stabilan mlaz, no glavni nedostaci su zapaljivost, osjetljivost na oksidaciju i toksičnost pri udisanju, zbog čega zahtijeva oprezno rukovanje.[53,56]

Dimetilformamid (DMF) aprotonsko je otapalo visoke polarnosti ($\varepsilon \approx 37$) i vrelišta 153 °C, koje se u elektroispredanju rijetko koristi samostalno, ali je ključno u smjesama s hlapljivijim otapalima poput DCM-a, kloroforma ili THF-a.[51] Njegova prisutnost povećava vodljivost otopine, stabilizira mlaz i omogućuje formiranje homogenih vlakana.[54]

DMF dobro otapa polimere poput PCL-a, PLA-a, PU-a i PS-a te pogoduje inkorporaciji bioaktivnih molekula u vlakna, što ga čini važnim u farmaceutskim i biomedicinskim primjenama.[53,54] Glavni nedostatak DMF-a je visoka toksičnost, posebice hepatotoksičnost, pa zahtijeva strogo kontrolirane uvjete rada.[53]

Heksafluoroizopropanol (HFIP) specijalizirano je otapalo koje omogućuje otapanje teško topljivih i kristaliničnih biopolimera poput svile, kolagena i keratina zahvaljujući sposobnosti razgradnje međumolekulskih vodikovih veza.[57] Zbog niske površinske napetosti, visoke provodljivosti i točke vrelišta od oko 58 °C, HFIP omogućuje dobivanje homogenih i reproducibilnih nanovlakana.[58]

Koristi se u elektroispredanju za primjene u tkivnom inženjerstvu, regeneraciji živaca i sustavima za kontrolirano otpuštanje lijekova, ali njegova visoka cijena i toksičnost značajno ograničavaju širu uporabu.[24,58]

Izbor otapala ključan je korak u pripremi otopina za elektroispredanje jer utječe na topljivost polimera, stabilnost mlaza i morfologiju vlakana.[51,53] Akrilna kiselina služi kao reaktivni aditiv koji uvodi funkcionalne skupine; kloroform i diklorometan nude izvrsnu topljivost hidrofobnih polimera uz kontrolirano isparavanje; tetrahidrofuran omogućuje fleksibilnost i kompatibilnost s različitim polimerima; dok dimetilformamid povećava polarnost i stabilizira proces u smjesama.[24,51] Heksafluoroizopropanol, iako skup i toksičan, ostaje nezamjenjiv za otapanje i elektroispredanje proteina i drugih biopolimera.[24,53]

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva otapala korištenih u elektroispredanju[51,53]

Otapalo	Kemijska formula	Točka vrelišta (°C)	Polaritet /konst. dielektrična (ε)	Površinska napetost (mN/m)	Ključne značajke u elektroispredanju
Akrilna kiselina	$C_3H_4O_2$	141	~6,1	~27	Reaktivna, uvodi -COOH skupine, rijetko sama
Kloroform	$CHCl_3$	61,2	4,8	27,1	Odlično otapa PLA, PCL i PS; kombinira se s DMF
Diklorometan (DCM)	CH_2Cl_2	39,6	9,1	27,2	Vrlo hlapljiv; glatka vlakna u smjesama (DCM/DMF)
Tetrahidrofuran (THF)	C_4H_8O	66,0	7,6	26,4	Univerzalno otapalo, dobra ravnoteža volatilnosti
Dimetilformamid (DMF)	$HCON(CH_3)_2$	153	36,7	37,1	Visoka polarnost i provodljivost;

					nužan kao kosolvent
Heksafluoroizopropanol (HFIP)	$(CF_3)_2CHOH$	58	~16,7	21,9	Otapa proteine i biopolimere; vrlo skupo i toksično

Kao što tablica pokazuje, otapala se značajno razlikuju u ključnim parametrima: volatilnosti, polarnosti i površinskoj napetosti. Ta svojstva izravno utječu na proces elektroispredanja.

- Vrelište
  - Otapala s vrlo niskim vrelištem poput DCM-a (39 °C) isparavaju gotovo trenutačno, što pomaže u brzom formiranju vlakana, ali i povećava rizik od poroznosti.
  - S druge strane, DMF s vrelištem 153 °C ostaje dugo u vlaknima, što može uzrokovati ljepljivost i nepotpuno formiranje, no u smjesama uravnotežuje sustav.
  - HFIP i kloroform, sa srednjim vrelištima (58–61 °C), pružaju optimalnu kontrolu isparavanja i često se smatraju zlatnim standardom za dobivanje homogenih vlakana.
- Polarnost i električna provodljivost:
  - DMF dominira s vrlo visokom dielektričnom konstantom ($\varepsilon \approx 37$), što ga čini izvrsnim u stabilizaciji mlaza, osobito u kombinacijama s nepolarnim otapalima.
  - Akrilna kiselina i HFIP imaju srednje vrijednosti, ali donose dodatne funkcionalnosti (HFIP otapa proteine, akrilna kiselina uvodi -COOH skupine).
  - Kloroform i DCM su nisko polarni, pa sami često nisu dovoljni za stabilno elektroispredanje.
- Površinska napetost:
  - Niska površinska napetost (HFIP ~21 mN/m) olakšava formiranje tankih vlakana.
  - Više vrijednosti (DMF ~37 mN/m) zahtijevaju dodatnu optimizaciju napona i viskoznosti.
  - Kombinacije otapala često se koriste upravo radi balansiranja površinske napetosti i viskoznosti.
- Sigurnosni i ekotoksični aspekti

Kod primjene otapala u elektroispredanju ne smiju se zanemariti sigurnosni i ekološki rizici:

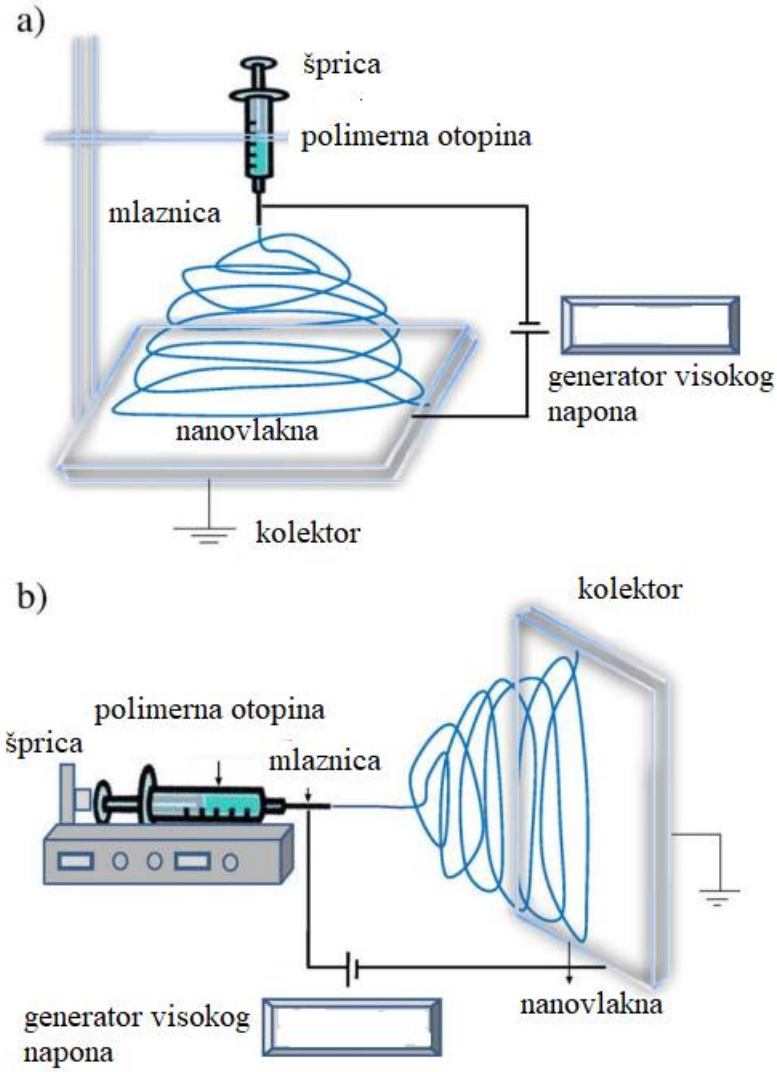
- Kloroform i DCM – potencijalno kancerogeni, neurotoksični i iritativni, zahtijevaju rad u digestoru.
- THF – sklon stvaranju peroksida, zapaljiv i toksičan.
- DMF – hepatoksičan, može izazvati sustavne zdravstvene problem.
- HFIP – vrlo toksišan, skup i izaziva neurotoksične učinke pri udisanju.
- Akrilna kiselina - korozivna i sklonost spontanom polimeriziranju zahtijeva oprezno skladištenje.[51,53,59]

Unatoč ovim ograničenjima, njihova uloga u pripremi nanovlakana ostaje nezamjenjiva, pa se istraživanja sve više usmjeravaju prema razvoju zelenih otapala (npr. etanol, voda, ionske tekućine, dubotopivi eutektici) koji bi mogli zamijeniti toksičnije opcije.[51,53]

2.1.3. Mehanizam elektroispredanja

Elektroispredanje se smatra obećavajućom, visoko produktivnom i jednostavnom metodom proizvodnje nanovlakana od polimera, kompozita i anorganskih materijala, uključujući karbide, okside, nitride i hibridne kompozite. U procesu se upotrebljavaju elektrostatičke sile za proizvodnju nanovlakana iz polimerne otopine.[60]

Kao što je prikazano na slici 1, postoje dvije osnovne postavke aparature za tehniku elektroispredanja: okomito i vodoravno. Općenito, postupak se provodi na sobnoj temperaturi u atmosferskim uvjetima.[8]



Slika 1. Shematski prikaz: (a) vertikalna postava i (b) horizontalna postava aparature za proces elektroispredanja.[8]

Općenito, postava za elektroispredanje sastoji se od tri glavne komponente, to su: (i) visokonaponski izvor istosmjerne struje, (ii) pumpa; šprica, i (iii) uzemljeni kolektor.[60]

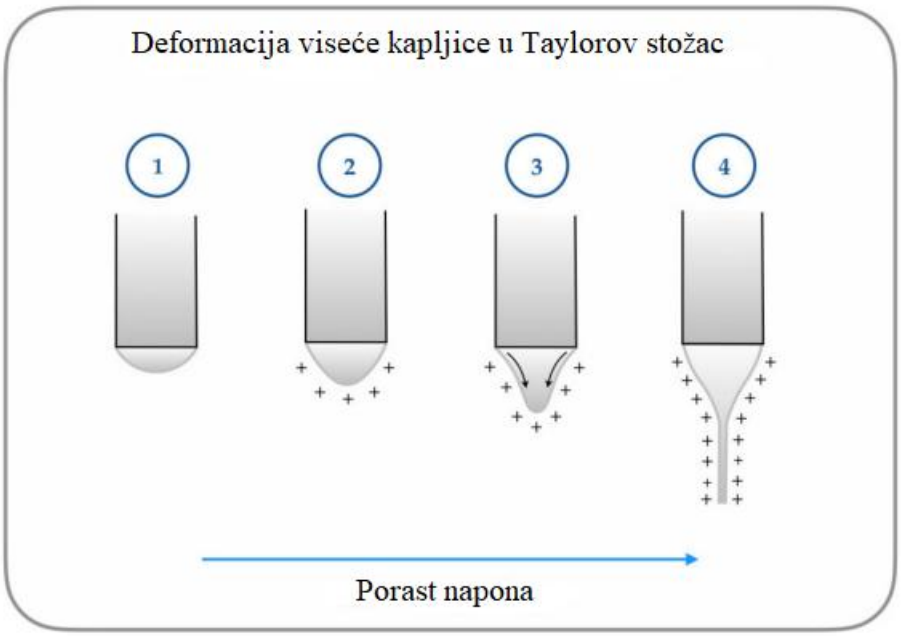
Prije početka samog procesa, polimer je potrebno otopiti u otapalu, kao što je npr. kloroform, voda ili etanol, kako bi se pripremila otopina polimera. U procesu elektroispredanja, pumpa se koristi za izbijanje otopine kroz iglu koja je pričvršćena na špricu s kontroliranom brzinom protoka.[61]

Za prevladavanje površinske napetosti na nabijenoj polimernoj otopini potrebno je nekoliko desetaka kV istosmjernog napona kako bi se osigurala značajna odbojna električna sila.[62]

Naboj se inducira u otopini kada se na nju primjeni visoki napon. Kao rezultat, to će uzrokovati odbojnu interakciju između istih naboja u otopini koja se povećava s povećanjem električnog polja induciranog visokim naponom. Taylorov stožac nastaje kada su električne sile u otopini uravnotežene površinskom napetosti. Kada te električne sile postanu veće od površinske napetosti otopine, mlaz nabijenih vlakana izbacuje se iz Taylorovog stošca.[61]

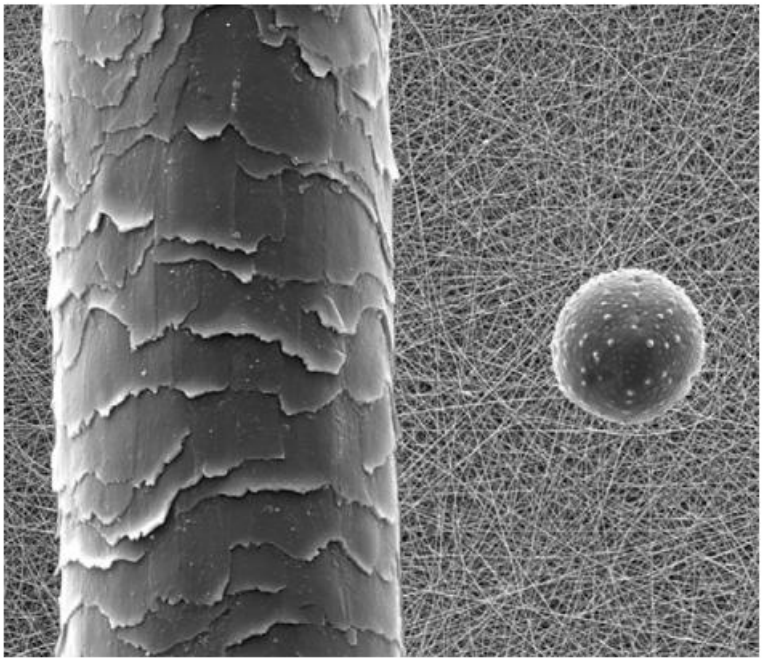
Mlaz time postaje duži i tanji, s rastućom petljom velikog promjera, što rezultira skrućivanjem polimera zbog hlapljenja otapala. Stvrdnuta nanovlakna se zatim skupljaju na meti, uzemljenom kolektoru.[60]

Kapljica otopine polimera prolazi kroz četiri faze deformacije pod utjecajem visokog napona koje su detaljno prikazane na Slici 2. Kao što je već rečeno, primjenom napona nabijeni ioni se kreću akumulirati oko kapljice otopine polimera, te stoga povećanjem tog napona omogućuje se Coulombovoj odbojnoj sili između iona da prevlada silu površinske napetosti i deformira kapljicu otopine polimera u ono što je poznato kao „Taylorov stožac“. Naposljetku, pri kritičnom naponu, fini mlaz vlakana ekstrudira se s vrha Taylorovog stošca prema uzemljenom kolektoru. Otapalo (ako je prisutno) isparava tijekom vremena kada vlakno dosegne kolektor, što rezultira stvaranjem suhe guste vlaknaste mreže.[63]



Slika 2. Faze deformacija kapljice polimerne otopine/taline u elektroispredanju: Faza 1 - nema deformacije kada nema ni napona. Faza 2 - naboji se nakupljaju oko kapljice primjenom nižeg napona. Faza 3 - Coulombova odbojna sila nadjačava površinsku napetost i kapljica se počinje deformirati u Taylorov stožac. Faza 4 - pri visokom naponu, Taylorov stožac ulazi u "mlazni" način rada i vlakno se ekstrudira iz vrha.[63]

Na Slici 3. koja slijedi prikazana je usporedna veličina nanovlakna kako bi se dobila bolja predodžba o stvarnoj veličini elektroispredenih nanovlakana.



Slika 3. Slika (x1000) ljudske dlake s lijeve strane i peludnog zrna s desne strane snimljena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) koja ističe koliko su zapravo mala elektroispredena polimerna nanovlakna, prikazana u pozadini.[64]

2.1.4. Parametri postupka elektroispredanja

Na glatkoću izvođenja i učinkovitost procesa elektroispredanja utječu razni parametri, ti parametri se mogu podijeliti u sljedeće kategorije: parametri otopine, parametri procesa i parametri okoline. Parametri otopine uključuju: viskoznost, vodljivost, molekulsku masu i površinsku napetost otopine. Dok procesni parametri uključuju primijenjene napone, udaljenost

od vrha igle do kolektora, brzinu protoka i električno polje inducirano kolektorom. Na kraju, parametri okoline uključuju temperaturu i vlažnost okoline.[9]

Na koji način svaki od ovih parametara utječe na morfologiju i promjer proizvedenih nanovlakana može se vidjeti u tablici 2.

Tablica 2. Parametri procesa, otopine i okoline u procesu elektroispredanja i njihov utjecaj na morfologiju vlakana.[63]

Procesni parametri	Porast parametra	Smanjenje parametra
Napon 	- Manji Taylorov stožac, tanja vlakna, manje pore - Vrlo visoki napon uzrokuje višestruke mlazove i može rezultirati stvaranjem kuglica	- Veći Taylorov stožac, deblja vlakna, veće pore - Nedovoljan napon zaustavlja stvaranje mlaza
Brzina protoka 	- Deblja vlakna, veće pore - Prekomjerna brzina protoka uzrokuje napuhnuti Taylorov stožac i vlažna vlakna	- Tanja vlakna, manje pore - Premala brzina uzrokuje povlačenje Taylorovog stošca u mlaznicu
Udaljenost od vrha do kolektora 	- Uzrokuje učinkovito smanjenje gustoće električne struje, što rezultira debljim vlaknima - Velika udaljenost često nije prikladna za brzo hlapiva otapala	- Smanjenje udaljenosti uzrokuje efektivno povećanje gustoće električne struje - Za formiranje vlakana potrebna je određena minimalna udaljenost
Parametri otopine	**Porast parametra**	**Smanjenje parametra**
Koncentracija polimera 	- Deblja vlakna, veće pore - Vrlo visoka koncentracija zaustavlja elektroispredanje - Srednja koncentracija daje kombinaciju kuglica i vlakana.	- Tanja vlakna, manje pore - Vrlo niska koncentracija rezultira stvaranjem kuglica - Ako je polimer dovoljno vodljiv, dolazi do elektroraspršivanja pri vrlo niskim koncentracijama
Provodljivost 	- Tanja vlakna, manje pore - Otopine s vrlo visokom vodljivošću mogu biti nestabilne tijekom elektroispredanja i vjerojatno će proizvesti više mlazova	- Deblja vlakna, veće pore - Za elektroispredanje je potrebna određena minimalna vodljivost

Viskoznost 	- Deblja vlakna, veće pore - Iznimno viskozne otopine ne mogu se elektroispredati	- Tanja vlakna, manje pore - Vrlo niska viskoznost uzrokuje stvaranje kuglica
Površinska napetost 	- Otežava elektroispredanje i rezultira nestabilnošću mlazova - Otopine s vrlo visokom površinskom napetošću ne mogu se elektroispredati	- Vrlo niska površinska napetost povećava sklonost lomljenju mlaza i rezultira stvaranju kapljica
Molekulska masa 	- Kuglice smanjene ako ih ima, proizvedena su deblja vlakna	- Debljina vlakana se smanjuje - Vrlo niska molekulska masa uzrokuje stvaranje kuglica
Okolišni parametri	**Porast parametra**	**Smanjenje parametra**
Temperatura 	- Promjer vlakana se smanjuje	- Promjer vlakana se povećava
Vlažnost 	- Veća vlažnost uzrokuje tanja vlakna zbog sporijeg hlapljenja otapala - Povećava učestalost i veličinu kružnih pora na vlaknima - Ne proizvode se upotrebljiva vlakna preko kritične granice	- Niža vlažnost omogućuje bolje i brže hlapljenje otapala, što rezultira debljim vlaknima

Parametri otopine i procesni parametri u elektroispredanju nanovlakana

Elektroispredanje je složen proces koji ovisi o brojnim čimbenicima, od kojih su ključni parametri otopine i parametri procesa. Svaka promjena u ovim parametrima može značajno utjecati na morfologiju, uniformnost i dimenzije dobivenih nanovlakana, što je posebno važno u biomedicinskim primjenama, kao što su tkivno inženjering, isporuka lijekova ili razvoj

biosenzora.[51,53,55] Razumijevanje tih parametara omogućava kontrolu nad konačnim svojstvima nanovlakana i optimizaciju procesa za specifične potrebe.[51,53]

2.1.5 Parametri otopine

Parametri otopine igraju ključnu ulogu u oblikovanju nanovlakana jer definiraju mehanička i elektrostatička svojstva polimernog mlaza. Među najvažnijima su viskoznost, koncentracija polimera, molekulska masa polimera, vodljivost i površinska napetost.[51,53]

Viskoznost otopine predstavlja otpornost fluida na protok i direktno je povezana s lančanim interakcijama polimera unutar otapala. Niska viskoznost pogoduje stvaranju kapljica i kuglica jer elektrostatske sile prevladavaju nad kohezijom polimera, dok previsoka viskoznost otežava formiranje Taylorovog stošca i stabilnog mlaza.[51,53,54] Optimalna viskoznost omogućuje dobivanje vlakana s ujednačenim promjerom i minimalnim defektima, a u praksi se regulira koncentracijom polimera, molekulskom masom, tipom otapala i temperaturom.[53,54]

Koncentracija polimera u otopini kritična je jer određuje količinu polimernih lanaca dostupnih za formiranje vlakana. Pri niskim koncentracijama elektrostatske sile uzrokuju prekidanje mlaza i formiranje kuglica, dok previsoke koncentracije dovode do povećane viskoznosti i stvaranja zgužvanih vlakana.[51,53] Postoji tzv. kritična koncentracija pri kojoj je omogućena dovoljna kohezivnost mlaza bez prekida procesa. Povećanje koncentracije polimera obično rezultira vlaknima većeg promjera, dok niže koncentracije proizvode tanja vlakna, ali s većom učestalošću defekata.[53,54]

Molekulska masa polimera ima sličan utjecaj, jer određuje stupanj ispreplitanja lanaca. Polimeri visoke molekulske mase daju stabilnija vlakna i bolju mehaničku čvrstoću, dok niska molekulska masa može dovesti do fragmentiranog mlaza i nepravilnih vlakana.[51,54] Primjerice, polikaprolakton (PCL) s višom molekulskom masom formira glatka i fleksibilna vlakna, dok polimeri niske molekulske mase često zahtijevaju dodatke ili miješanje s drugim polimerima radi poboljšanja procesabilnosti.[53]

Vodljivost polimera ili otopine predstavlja sposobnost provođenja električnog naboja, što je ključno za formiranje Taylorovog stošca i stabilnog mlaza. Otopine s niskom vodljivošću zahtijevaju veće napone za iniciranje procesa, što može dovesti do nestabilnog elektroispredanja i većeg broja defekata, dok previsoka vodljivost može rezultirati savijanjem mlaza i stvaranjem poroznih vlakana.[51,53,54] Vodljivost se u praksi regulira dodavanjem soli, kiselina ili baza, uz uvjet kompatibilnosti s polimerom i otapalom.[51,53]

Napetost površine utječe na stabilnost mlaza pri izlasku iz igle. Visoka površinska napetost otežava iniciranje mlaza, dok niska pogoduje formiranju Taylorovog stošca, ali može uzrokovati raspršivanje kapljica. Kontrola površinske napetosti, primjerice dodavanjem surfaktanata, omogućava stabilniji proces i smanjenje pojave kuglica i neujednačenih promjera vlakana.[53,54]

2.1.6. Parametri procesa

Osim svojstava otopine, parametri procesa igraju jednako važnu ulogu u elektroispredanju. Među najvažnijima su primijenjeni napon i udaljenost od vrha igle do kolektora. Napon generira električno polje koje izvlači polimerni mlaz i mora biti dovoljno visok da prevlada površinsku napetost kapljice te omogući formiranje Taylorovog stošca.[51,53]

Nizak napon dovodi do neuspješnog pokretanja mlaza ili stvaranja kapljica, dok previsok napon može uzrokovati nestabilan mlaz, povećano savijanje i varijacije u promjeru vlakana.[53,54] Optimalni napon ovisi o viskoznosti, koncentraciji, vodljivosti i napetosti površine otopine, a u praksi se podešava eksperimentalno radi postizanja stabilnog i ujednačenog mlaza.[51,54]

Udaljenost od vrha igle do kolektora određuje vrijeme leta mlaza i brzinu isparavanja otapala. Kratka udaljenost može uzrokovati nepotpuno isparavanje i stvaranje ljepljivih ili deformiranih vlakana, dok prevelika udaljenost dovodi do prekomjernog istezanja, lomljenja mlaza i formiranja vrlo tankih ili poroznih vlakana.[51,53] Optimalna udaljenost osigurava stabilno oblikovanje Taylorovog stošca, kontroliranu disipaciju naboja i ravnomjerno isparavanje otapala, što rezultira glatkim i uniformnim vlaknima.[51,54] Osim toga, ona utječe i na raspored vlakana na kolektoru: manja udaljenost dovodi do zbijenijih vlakana, dok veća pogoduje ravnomjernijem formiranju mrežastih struktura.[53,54]

U konačnici, optimalno kombiniranje parametara otopine i procesa ključno je za uspješno elektroispredanje. Promjene bilo kojeg parametra mogu značajno utjecati na morfologiju, promjer, poroznost i mehanička svojstva nanovlakana.[51,53] Razumijevanje tih parametara omogućuje razvoj vlakana prilagođenih specifičnim zahtjevima, poput brzine otpuštanja lijeka, mehaničke čvrstoće u tkivnom inženjeringu ili adsorpcije biomolekula u senzorskim aplikacijama.[53,55] Kombinacijom teorijskog znanja i eksperimentalnog podešavanja moguće je dobiti nanovlakna s precizno kontroliranim svojstvima, što elektroispredanje čini izuzetno fleksibilnom i vrijednom tehnikom u znanosti o materijalima i biomedicini.

2.2. Tkivno inženjerstvo

Bolesti, traume i ozljede česti su uzroci oštećenja tkiva. Tkivno inženjerstvo ima veliki potencijal za razvoj funkcionalnih struktura koje oponašaju prirodna tkiva i poboljšavaju ili zamjenjuju biološke funkcije. Riječ je o interdisciplinarnom području koje objedinjuje biologiju, inženjering i znanost o materijalima s ciljem razvoja bioloških zamjena za obnovu ili nadomještanje organa i tkiva.[65]

Ključni cilj tkivnog inženjerstva je stvaranje trodimenzionalnih (3D) matrica koje omogućuju pravilnu organizaciju i diferencijaciju stanica, osiguravaju prokrvljenost, transport nutrijenata i otpornost na mehaničke sile. U tom kontekstu, elektroispredanje je tehnologija koja je u posljednjim desetljećima privukla veliku pažnju jer omogućuje proizvodnju vlakana nanometarskih do mikrometarskih dimenzija koja oponašaju prirodnu ekstracelularnu matricu (ECM).[53,55]

U mnogim granama tehnologije elektroispredanje je izazvalo veliku pažnju zbog sposobnosti stvaranja nanovlakana koja oponašaju prirodni izvanstanični matriks (ECM).[8,53] Dobivena vlakna odlikuju se visokim omjerom površine i volumena, poroznom strukturom i kontinuiranošću, što pogoduje migraciji stanica, adsorpciji bioaktivnih molekula te difuziji kisika i hranjivih tvari.[51,53]

Polimerni materijali za elektroispredanje mogu biti prirodni, sintetski ili njihove kombinacije. Prirodni polimeri, poput kolagena, želatine, svile, hitina i alginata, poznati su po visokoj biokompatibilnosti i interakciji sa stanicama, dok sintetski polimeri poput polilaktida (PLA), polikaprolaktona (PCL) i poliglikolida (PGA) nude kontroliranu razgradnju i predvidljiva mehanička svojstva.[8,51] Često se kombiniraju prirodni i sintetski polimeri kako bi se optimizirala biorazgradnja, mehanička čvrstoća i biološka funkcionalnost matrica.[8]

2.2.1. Strukturalne karakteristike elektroispredenih matrica

Nanovlakna proizvedena elektroispredanjem mogu imitirati fibrilarni sastav ECM-a, što je ključno za regulaciju adhezije, migracije i proliferacije stanica.[44,53] Promjer vlakana u rasponu od 50–500 nm, približen prirodnim kolagenskim fibrilima, omogućuje optimalnu interakciju s integrinima i receptorima na staničnoj membrani.[53] Poroznost matrice olakšava infiltraciju stanica i difuziju nutrijenata, dok orijentacija vlakana može usmjeriti staničnu migraciju i diferencijaciju, što je posebno važno u regeneraciji mišićnog, živčanog i ligamentarnog tkiva.[44,55] Kontrola orijentacije vlakana postiže se uporabom rotirajućih bubnjeva, šupljih kolektora ili elektrostatčkog usmjerenja mlaza.[55]

2.2.2. Polimerni materijali i njihova funkcionalizacija

Prirodni polimeri poput kolagena, elastina, želatine, svile i hitina koriste se zbog svoje bioaktivnosti i sposobnosti modulacije staničnog odgovora. Kolagen i elastin osiguravaju strukturalnu i elastičnu potporu, želatina donosi hidrofilnost i biokompatibilne ligande za adheziju stanica, dok se svila ističe mehaničkom čvrstoćom i sporijom razgradnjom.[8,51] Hitin i hitozan posjeduju antimikrobna i imunomodulatorna svojstva, što ih čini pogodnima za primjene u regenerativnoj medicini.[51,60]

Sintetski polimeri, s druge strane, omogućuju preciznu kontrolu stope degradacije i mehaničkih svojstava. Polikaprolakton (PCL) se koristi zbog sporog razgradnog profila pogodnog za dugotrajne implantate, dok polilaktid (PLA) i poliglikolid (PGA) nude bržu razgradnju i dobru kompatibilnost s farmakološki aktivnim tvarima.[8,60]

Funkcionalizacija vlakana dodatnim bioaktivnim molekulama, poput peptida, proteina ili faktora rasta, omogućuje ciljanu stimulaciju stanica. Na primjer, vlakna impregnirana faktorom rasta fibroblasta (FGF) mogu potaknuti proliferaciju fibroblasta, dok dodavanje RGD peptida poboljšava adheziju i diferencijaciju stanica.[66,67] Osim toga, kombinacija elektroispredenih vlakana s mikroporoznim ili hidrogelnim matricama omogućuje razvoj hibridnih scaffoldova koji istovremeno pružaju mehaničku podršku, transport molekula i regulatornu signalizaciju.[60]

2.2.3. Primjena u regeneraciji različitih tipova tkiva

Koža: Elektroispredana vlakna omogućuju stvaranje privremenih dermalnih matrica koje podržavaju rast keratinocita i fibroblasta. Nanovlaknaste matrice potiču proliferaciju stanica, stvaranje kolagena i ubrzano zacjeljivanje rana. Kombinacija prirodnih i sintetskih polimera, primjerice PCL/želatina, pruža ravnotežu između mehaničke čvrstoće i biološke aktivnosti.[60,68]

Kost i hrskavica: Za regeneraciju kosti koriste se vlakna mineralizirana kalcij-fosfatnim solima ili hidroksiapatitom, koja potiču osteoblastnu diferencijaciju i stvaranje mineralizirane matrice. U hrskavičnim aplikacijama, elektroispredana vlakna u kombinaciji s hidrogelima osiguravaju elastičnost i otpornost na kompresiju.[60,69]

Mišići i tetive: Orijentirana vlakna služe kao vodiči za rast mišićnih i tetivnih stanica. Kontrolirana orijentacija vlakana potiče linearni rast mišićnih vlakana i organizaciju snopova, što poboljšava kontraktilnu funkciju regeneriranog tkiva.[44,53]

Živčano tkivo: U regeneraciji perifernih živaca elektroispredana vlakna se koriste kao vodiči (nerve conduits) koji usmjeravaju rast aksona. Orijentirana nanovlakna potiču rast i diferencijaciju neurona, dok bioaktivne molekule i neurotrofični faktori dodatno poboljšavaju funkcionalnu regeneraciju.[60,66]

Kardiovaskularni sustav: Elektroispredana vlakna omogućuju izradu vaskularnih graftova i srčanih patch-eva. Orijentacija vlakana daje mehaničku čvrstoću i elastičnost, dok bioaktivni dodaci stimuliraju endotelizaciju i smanjuju trombogeni potencijal.[65,69]

2.2.4. Interakcija stanica s elektroispredenim vlaknima

Stanice prepoznaju mikro- i nanoskalnu topografiju elektroispredenih vlakana putem integrinskih receptora, što modulira njihovu adheziju, migraciju i diferencijaciju.[44,54] Orijentacija vlakana određuje polarnost stanica, dok gustoća i promjer vlakana utječu na proliferaciju; fibroblasti pokazuju optimalnu proliferaciju na vlaknima promjera 200–500 nm, dok veći promjeri mogu usporiti migraciju.[54] Osim toga, elektroispredana vlakna mogu se koristiti kao sustavi za kontrolirano otpuštanje faktora rasta, hormona ili lijekova, čime dodatno moduliraju stanični odgovor i potiču regeneraciju tkiva.[60]

2.2.5. Prednosti i izazovi primjene elektroispredanja u tkivnom inženjerstvu

Prednosti uključuju:

- Visoku površinu i poroznost za staničnu infiltraciju.
- Mogućnost kontrole morfologije i dimenzija vlakana.
- Integraciju bioaktivnih molekula i kontrolirano otpuštanje.
- Oponašanje fiziološke ekstracelularne matrice.[8,55]

Izazovi uključuju:

- Tehničke poteškoće u proizvodnji vlakana velikog volumena.
- Potrebu za biokompatibilnim i neotrovnim otapalima.
- Ograničenja u mehaničkoj čvrstoći tankih nanovlakana.[55]

Među dostupnim biopolimerima za elektroispredanje, poli (kaprolakton) (PCL) pokazao se vrlo povoljnim za primjenu u regeneraciji tkiva. U skladu sa karakteristikama različitih tkiva, PCL se može modificirati mijenjanjem funkcionalnih skupina ili kombiniranjem s drugim materijalima, kao što su sintetski polimeri, prirodni polimeri i metalni materijali, kako bi se poboljšala njegova fizikalno-kemijska, mehanička i biološka svojstva, čineći elektroispredenu mrežu u skladu sa različitim zahtjevima tkivnog inženjerstva i regenerativne medicine. Štoviše, teži se tome da se nanovlakna modificiraju s nekim bioaktivnim tvarima kako bi se stanicama osigurali potrebni kemijski signali i okoliš sličniji in vivo.[70]

2.2.6. Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis je sustavna autoimuna bolest obilježena kroničnim, simetričnim i erozivnim poliartritisom, a javlja se globalno u svim populacijama.[71,72] Reuma ili reumatizam označava skupinu od preko stotinu različitih bolesti koje zahvaćaju kosti, mišiće i zglobove.[72,73] Najčešći simptomi uključuju bol, ukočenost, smanjenu pokretljivost, oticanje i upalne procese.[71,73]

Reumatske bolesti povezuju se s autoimunim i upalnim reakcijama unutar zglobova i mišića. Degeneracija hrskavice igra ključnu ulogu u nastanku simptoma: s godinama dolazi do njezina propadanja, a ozljede mogu dodatno ubrzati taj proces. Kada hrskavica više nije prisutna ili je znatno oštećena, kosti se trljaju jedna o drugu, što izaziva upalu i bol.[71,72] Iako reuma može zahvatiti bilo koji zglob, najčešće se javlja u zglobovima prstiju, kukova i koljena.[72,73]

Reumatske bolesti mogu se klasificirati u četiri glavne skupine: autoimune, autoupalne, degenerativne i metaboličke poremećaje.[72] Reumatoidni artritis tipičan je primjer autoimune bolesti, pri kojoj imunosni sustav napada sinovijalnu membranu zglobova, uzrokujući kroničnu upalu.[71,72] Najčešće zahvaća manje zglobove, poput prstiju, šaka i skočnih zglobova, ali može pogoditi i veće zglobove, uključujući ramena i koljena. Simptomi obuhvaćaju bol, oticanje, dugotrajnu jutarnju ukočenost, umor, povišenu tjelesnu temperaturu i opći osjećaj slabosti.[71] Dijagnoza se postavlja kombinacijom kliničkih kriterija i slikovnih metoda, poput rendgenskih snimki ili ultrazvuka.[74]

Osteoartritis predstavlja najčešći oblik degenerativne bolesti zglobova, nastale uslijed postupnog propadanja hrskavice između zglobnih površina. Povezuje se s procesom starenja, mehaničkim opterećenjem zglobova, prethodnim ozljedama te genetskom predispozicijom.[75,76] Najčešće zahvaća zglobove koji trpe najveća opterećenja, poput koljena, kukova i ramena. Dijagnoza se postavlja kliničkim pregledom i radiološkim metodama, a bolest karakteriziraju bol pri pokretu, ukočenost, ograničenje pokreta i nastanak osteofita.[75]

Za razliku od reumatoidnog artritisa, autoimune bolesti koja se liječi imunosupresivima, kortikosteroidima i DMARD-ovima (eng. *Disease-modifying antirheumatic drug*), osteoartritis se uglavnom tretira fizikalnom terapijom, kontrolom tjelesne

težine, analgeticima i intraartikularnim kortikosteroidima.[71,76] Ako se ne liječi pravodobno, može dovesti do invaliditeta i znatnog smanjenja kvalitete života.[75,76]

Nesteroidni protuupalni lijekovi, poput indometacina, imaju važnu ulogu u simptomatskom liječenju zbog protuupalnog, analgetskog i dekongestivnog djelovanja. Njihov mehanizam temelji se na inhibiciji ciklooksigenaze (COX) i posljedičnoj smanjenoj sintezi prostaglandina i drugih upalnih medijatora.[77]

2.2.7. Indometacin

Indometacin je nesteroidni protuupalni lijek (NSAID – eng. *Nonsteroidal anti-inflammatory drug*) koji ublažava upalu, bol i povišenu temperaturu inhibicijom ciklooksigenaze i sinteze prostaglandina.[77] Primjenjuje se u liječenju upalnih reumatskih bolesti, uključujući reumatoidni artritis, ankilozantni spondilitis i psorijatični artritis, kao i kod degenerativnih bolesti zglobova poput osteoartritisa.[78] Posebno je učinkovit kod artritisa uzrokovanih kristalima, uključujući giht i pseudogiht.[79] Također se koristi u izvanzglobnim reumatskim stanjima, poput burzitisa, tendinitisa i sinovitisa, te u akutnim bolnim sindromima poput lumbalgije i dismenoreje.[78,79]

Indometacin je gotovo bez mirisa i okusa, što ga čini pogodnim za formulacije u obliku tableta, kapsula i oralnih otopina. Slabo je topljiv u vodi i većini organskih otapala, dok se dobro otapa u acetonu, dimetilformamidu (DMF) i diklormetanu (DCM), što se koristi u farmaceutskoj formulaciji i laboratorijskoj sintezi.[80]

Nakon oralne primjene indometacin se brzo apsorbira iz probavnog sustava, a maksimalne koncentracije u plazmi postižu se unutar 1–2 sata, ovisno o farmaceutskoj formulaciji i individualnim karakteristikama bolesnika.[80] Lijek se u visokom stupnju veže na proteine plazme, što utječe na distribuciju u tkivima. Metabolizira se u jetri, dok se najveći dio izlučuje putem bubrega.[78,80] U cerebrospinalnu tekućinu dospijeva u vrlo malim količinama, pa nema značajne učinke na središnji živčani sustav, iako posjeduje analgetsku aktivnost.[78] Poluživot u plazmi omogućuje režime doziranja jednom do dvaput dnevno.[80]

Indometacin se primjenjuje kod različitih reumatskih i degenerativnih bolesti, uključujući:

- **Reumatoidni artritis:** kronična autoimuna bolest koja uzrokuje upalu sinovijalne membrane, oticanje zglobova, bol i jutarnju ukočenost.
- **Seronegativni spondiloartritisi:** uključuju ankilozantni spondilitis, psorijatični artritis i Reiterov sindrom, gdje indometacin smanjuje upalu i bol.
- **Osteoartritis:** degenerativna bolest zglobova uzrokovana propadanjem hrskavice; lijek ublažava bolove i upalne procese.
- **Giht i pseudogiht:** akutne epizode artritisa uzrokovane taloženjem kristala u zglobovima; indometacin ubrzava smanjenje simptoma.
- **Izvanzglobni reumatizam:** uključuje burzitis, kapsulitis, tendinitis, tenosinovitis, sinovitis i humeroskapularni periartritis.
- **Akutna bol i postoperativna stanja:** lumbalgija, dismenoreja i postkirurška bol.[71,78,79]

Iako je indometacin učinkovit u ublažavanju boli i upale, njegova primjena može biti praćena nuspojavama. Najčešće se javljaju gastrointestinalne smetnje, uključujući mučninu, dispepsiju, bol u trbuhu te, rjeđe, ulceracije ili krvarenje.[78,80] Dugotrajna terapija povećava rizik od kardiovaskularnih događaja poput hipertenzije i infarkta miokarda, a moguće su i bubrežne i jetrene disfunkcije te kožne i alergijske reakcije.[78] Nuspojave su često povezane s dozom i trajanjem liječenja, pa je važno individualizirati terapiju i pratiti bolesnika.[80]

Indometacin može stupiti u interakcije s antikoagulansima, drugim NSAID-ovima, kortikosteroidima, diureticima i antihipertenzivima.[78] Kontraindiciran je kod bolesnika s preosjetljivošću na NSAID, aktivnim gastrointestinalnim ulkusima, teškom bubrežnom ili jetrenom insuficijencijom te određenim kardiovaskularnim bolestima.[77,80] Poseban oprez potreban je u starijih bolesnika zbog povećanog rizika od nuspojava.

Unatoč tim ograničenjima, indometacin ostaje jedan od ključnih NSAID-ova u kliničkoj praksi jer učinkovito smanjuje bol, upalu i otok, značajno poboljšavajući kvalitetu života bolesnika.[77,78]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Prilikom provođenja istraživanja korištene su sljedeće navedene tvari:

Tablica 3. Korišteni reagensi

Tvar	Formula	Proizvođač	CAS broj
Polivinilpirolidon (PVP)	$(C_6H_9NO)_n$	Fluka Chemie Gmbh, Buchs,	9003-39-8

		Switzerland	
Polikaprolakton (PCL)	$(C_6H_{10}O_2)_n$	n.p.	n.p.
N,N-Dimetilformamid (DMF)	$(CH_3)_2NCHO$	GRAM-MOL.d.o.o., Zagreb, Hrvatska	68-12-2
Diklormetan (DCM)	CH_2Cl_2	CARLO ERBA Reagents S.A.S, Val de Reuil, Francuska	75-09-2

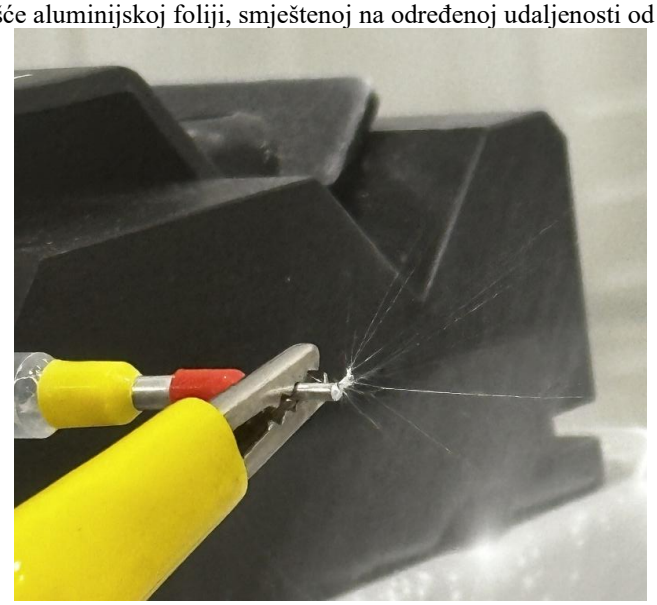
3.2. Oprema

Sva korištena aparatura prikazana je tablicom 4.
Tablica 4. Specifikacija aparature potrebne za provedbu eksperimenta

Naziv aparature	Specifikacije	Područje primjene
Analitička vaga	Sartorius GL224I-1S	vaganje uzraka
Optički mikroskop	OLYMPUS SC50	karakterizacija dobivene otopine i nanočestica
Ultrazvučna miješalica	TRANSSONIC 460/H	razbijanje aglomerata
UV/Vis spektrometar	SHIMADZU UV 1280	karakterizacija dobivene otopine i utvrđivanje prisutnosti nanočestica
Ultrazvučni homogenizator	BADELIN UW 2070	razbijanje aglomerata
Pametna pumpa za šprice	Kd Scientific, LEGATO210	istiskivanje materijala prilikom elektroispredanja
Skenirajući elektronski mikroskop	SEM	Tescan Vega

Metoda elektroispredanja

Provedeno je elektroispredanje PCL nanovlakana iz smjese otapala dimetilformamida i diklormetana u omjeru 1:4 i elektroispredanje PCL nanovlakana iz iste smjese otapala s otopinom nanočestica bakra. Elektroispredanje je metoda kojom se pomoću elektrostatskog potencijala pri velikoj voltaži i slaboj struji stvaraju ultrafina vlakna. Za sam proces elektroispredanja potrebna je otopina polimera ili otopljeni polimer, koji se zatim unosi u iglu štrcaljku te pod određenim pritiskom na iglu i pri velikom naponu polimer izlazi na kolektor u obliku vlakna. Kapi polimera, koje su zbog napetosti površine sfernog oblika, se pod utjecajem velikog napona, pri čemu dolazi do kretanja naboja, rastežu i mijenjaju prvobitan oblik u oblik Taylorovog stožca. Dobro namještanje parametara sila odgovornih za stvaranje Taylorovog stožca upravljanjem brzinom protoka, udaljenosti igle od mete, promjerom igle i naponom pogoduju stvaranju stabilnog mlaza. Kako se električki nabijeni mlaz kreće, dolazi do isparavanja otapala i stvaranja vlakana koje možemo vidjeti na slici 4. Depozicija vlakana se odvija na metalnom kolektoru, najčešće aluminijskoj foliji, smještenoj na određenoj udaljenosti od vrha same šprice.

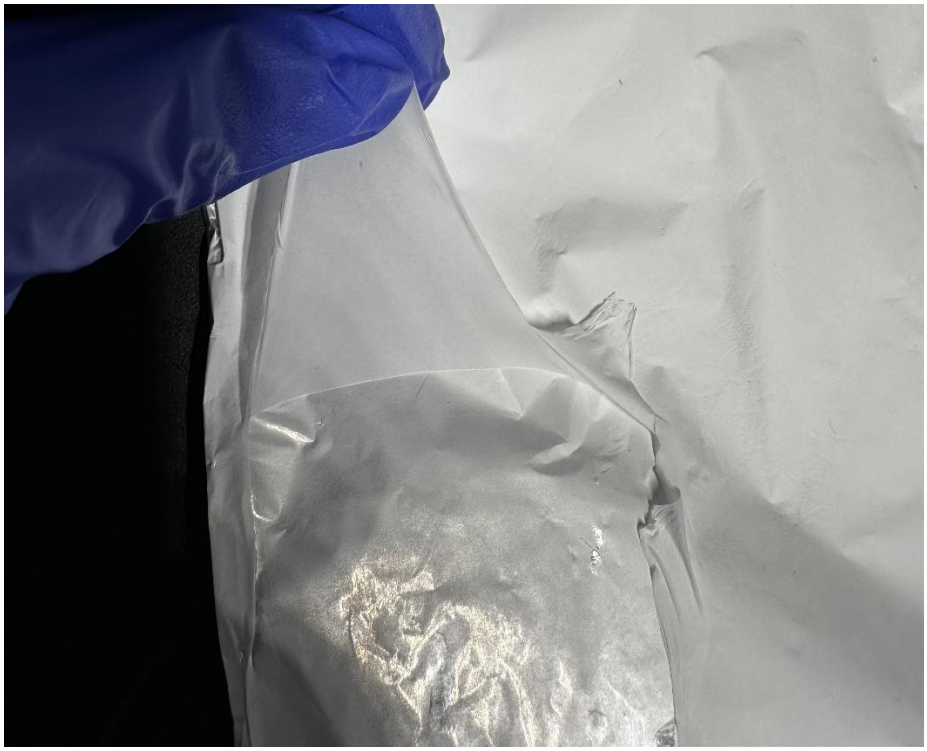


Slika 4. Prikaz električki nabijenog mlaza i stvaranja vlakana

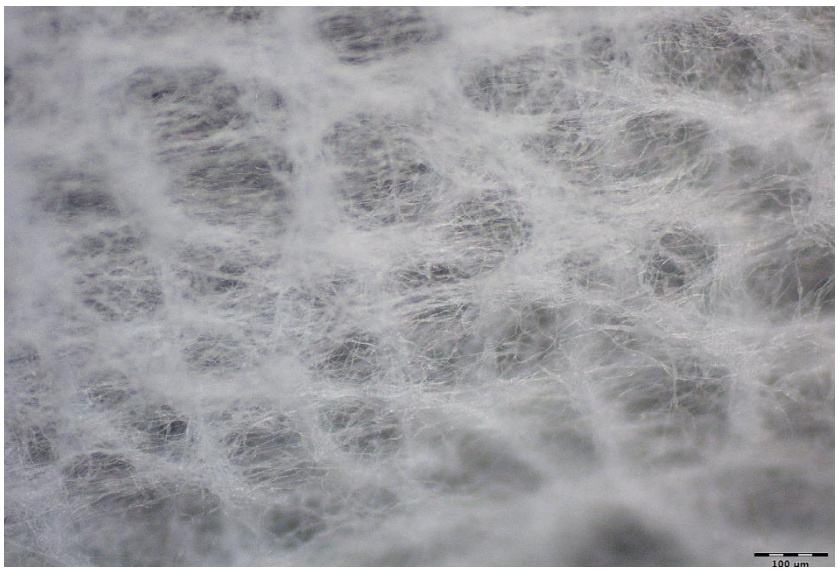
Pripremljeni uzorak apliciran je u špricu opremljenu improviziranom iglom ravnog vrha (slika 5.) postavljen na udaljenost od 10 cm od metalne ploče. Šprica je spojena na izvor visokog napona, a elektroispredanje je provedeno pri naponu od 17 kV i protoku od 0,017 mL/min. Spajanje aparature prikazano je slikom 8. Po završetku procesa elektroispredanja, dobiveni materijal (slika 6.) ostavljen je na sušenje pri sobnim uvjetima. Nakon sušenja, uzorci su podvrgnuti analizi optičkim mikroskopijom te karakterizaciji metodom SEMa.



Slika 5. Korištena improvizirana igla u procesu zbog potrebnog ravnog vrha

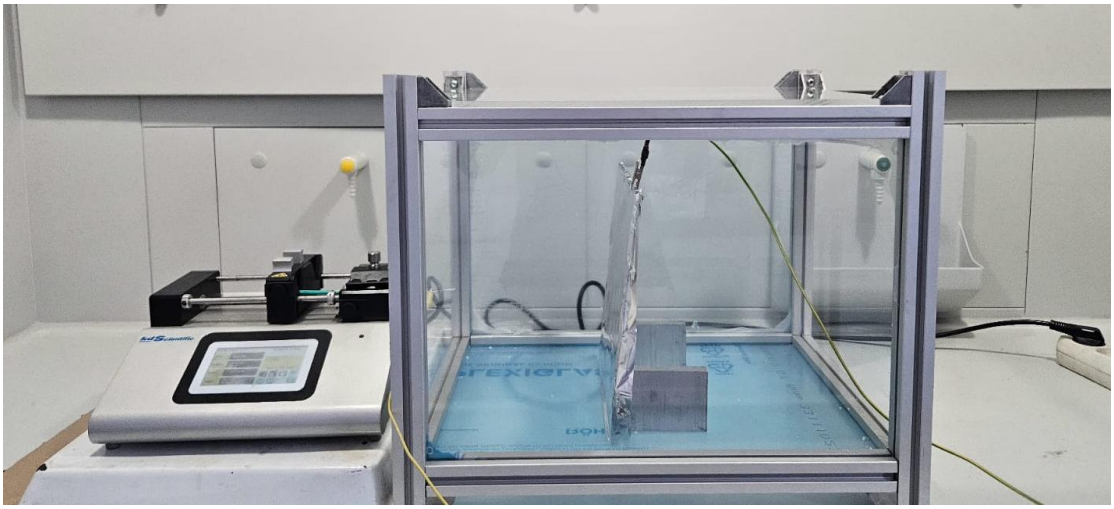


Slika 6. Dobivena prostirka po završetku procesa



Slika 7. Prikaz prvog uspješno dobivenog elektroispredenog uzorka snimljen optičkim mikroskopom, uvečanje redom 5x, 10x, 50x

Slikom 7 prikazan je prvi uspješno dobiveni elektroispredeni uzorak snimljen optičkim mikroskopom, nakon čijeg se dobivanja kretalo dalje sa razvijanjem metode. Uvečanje se kreće odozgo prema dolje, redom: 5x, 10x i 50x. Uzorak je dobiven preliminarnim testovima, elektroispredena otopina na slici je 1 g PCL otopljen u 10 mL sustava otapala; DCM : DMF = 9 : 1, brzina protoka = 0,017 mL/min, napon 17 kV te udaljenost od vrha do kolektora 10 cm.

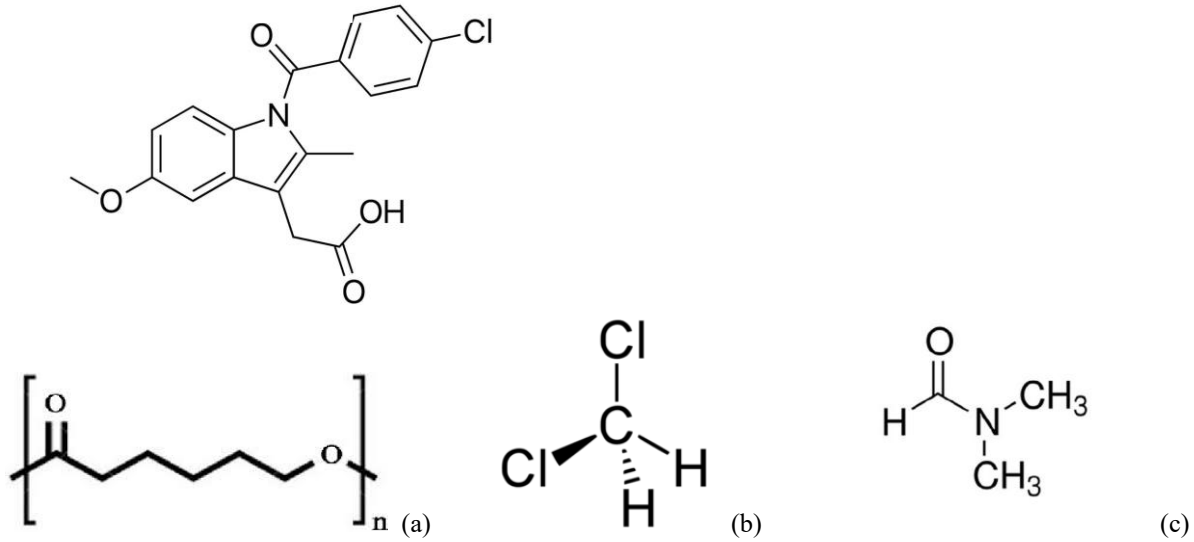


Slika 8. Aparatura potrebna za elektroispredanje

3.4. Metode pripreme nanovlakana PCL-a s indometacinom metodom elektroispredanja

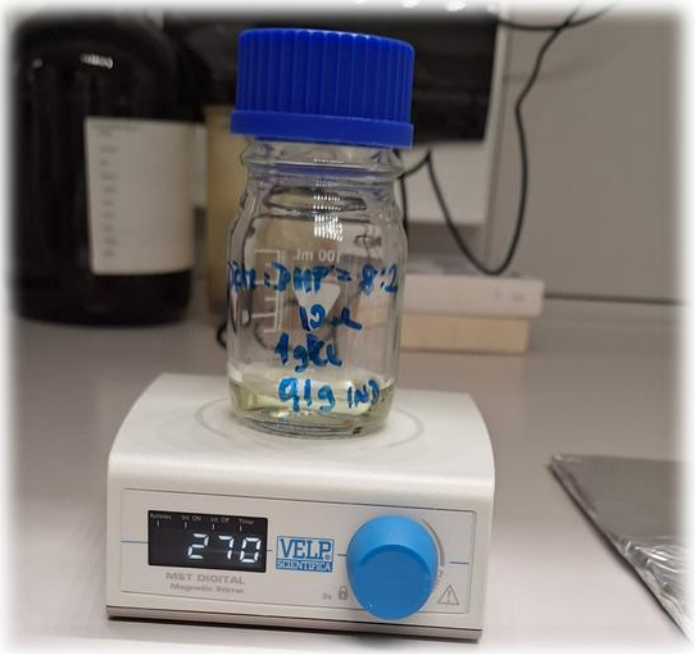
Temelj ovog rada bilo je odrediti procesne parametre elektroispredanja, kroz ogroman broj preliminarnih ispitivanja u kojima su procesni parametri varirani od najmanjih do najvećih vrijednosti. Nakon mnogobrojnih neuspjelih pokušaja određeni su nužni parametri za dobivanje nanovlakana, koji su bili slijedeći:

Za izradu nanovlakana potreban je 1 g PCL-a otopljenog pri sobnoj temperaturi u DCM-a i DMF-a. Isti omjer je korišten i za pripremu nanovlakana sa indometacinom prilikom čega je dodano 10% indometacina. Pripremljeni uzorak apliciran je u špricu opremljenu iglom ravnog vrha te postavljen na udaljenost od 10 cm od metalne ploče. Štrcaljka je spojena na izvor visokog napona, a elektroispredanje je provedeno pri naponu od 17 kV i protoku od 0,017 mL/min. Po završetku procesa elektroispredanja, dobiveni materijal ostavljen je na sušenje pri sobnim uvjetima. Nakon sušenja, uzorci su podvrgnuti analizi optičkim mikroskopom te karakterizaciji. Na slikama 9. i 10. prikazane su strukture indometacina, polikaprolaktona, diklormetana i dimetilformamida. Prikazana je i slika pripreme otopine miješanjem (slika 11.) te slika pripremljenih otopina (slika 12.).

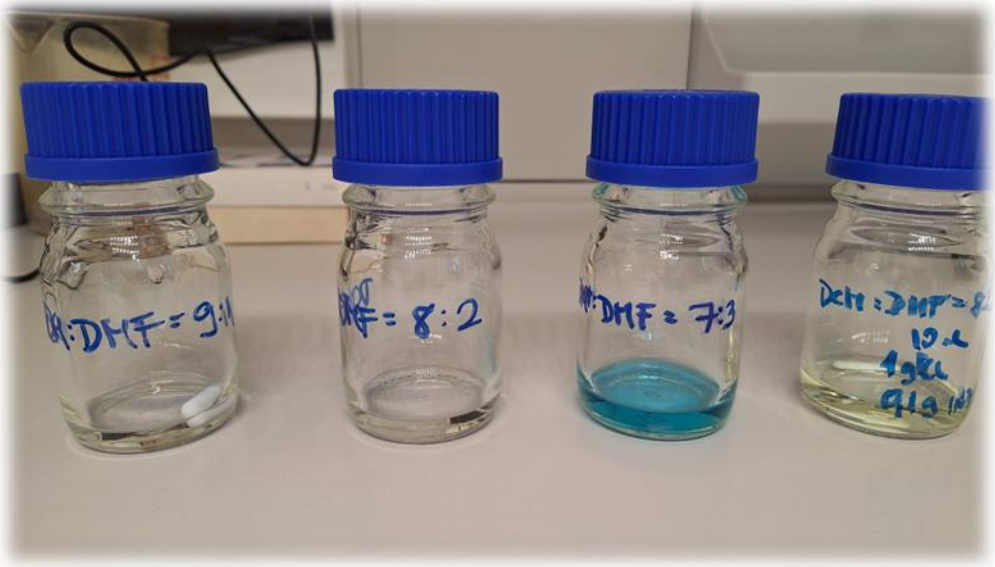


(a) (b) (c)

Slika 10. Strukture polikaprolaktona, diklormetana te dimetilformamida



Slika 11. Priprema otopine miješanjem

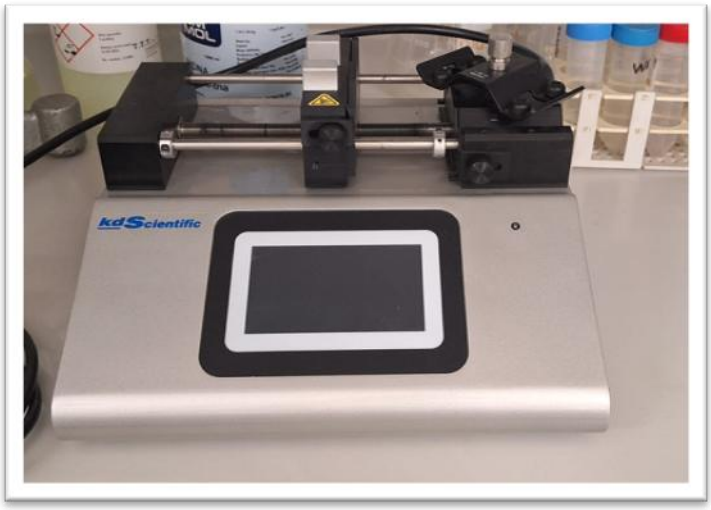


Slika 12. Pripremljene otopine

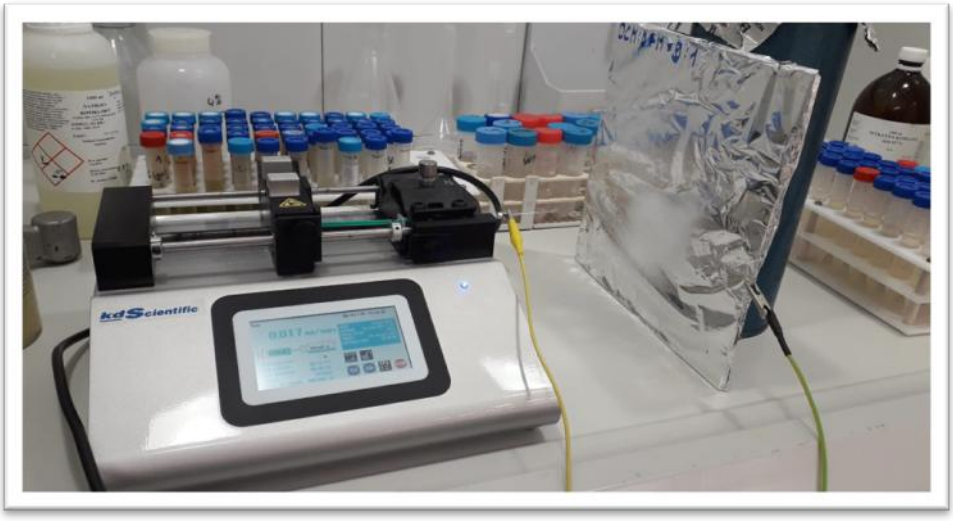
Aparatura za provedbu elektroispredanja sastoji se od izvora napona (slika 13.), pumpe za kontrolu protoka otopine (slika 14.) te kolektorske ploče za prikupljanje uzorka (slika 15.). Preliminarni pokusi provodili su se u digestoru u neizoliranom sustavu.



Slika 13. Izvor napona, Genvolt



Slika 14. Pumpa, kd Scientific



Slika 15. Provedba preliminarnih testova elektroispredanja

3.5. Metoda usitnjavanja pripremljenih nanovlakana PCL-a s indometacinom prije elektroispredanja

Uzorci biopolimera s indometacinom su skinuti s folije te su usitnjeni u visokobrzinskoj miješalici (slika 16.). U prvom pokusu uzorak 0,7g PCL sa 10% indometacina pomiješan je sa 100 mL otopine hijaluronske kiseline. Usitnjavanje se provodilo pri 3000 o/min. Hijaluronska kiselina je dodana formulaciji jer se i sama nalazi u ljudskom tijelu. To je prirodni

polisaharid koji se nalazi u koži, zglobovima, vezivnim tkivima, a ima vrlo bitnu ulogu u podmazivanju, zadržavanju vlage te regeneraciji.



Slika 16. Visokobrzinska miješalica

Dobivena je formulacija bijelo-prozirne boje (slika 17.). Za formulaciju je napravljena provjera prikladnosti aplikaciju u prostor zgloba. Uzorak je viskozan, no može se istisnuti špricom.



Slika 17. Dobivena formulacija

Kako bi se pratilo djelovanje lijeka u tkivu u formulaciju je dodan indikator briljant- zeleno koji je plave boje, kako bi lakše pratili difuziju pripravka kroz tkivo.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Preliminarnim eksperimentima ispitivane su razne kombinacije procesnih parametara. Kao što je opisano u teorijskom dijelu, parametri otopine i procesni parametri imali su ključnu ulogu u elektroispredanju nanovlakana jer su direktno utjecali na stabilnost mlaza, formiranje Taylorovog stošca, morfologiju i dimenzije dobivenih vlakana te njihova mehanička i funkcionalna svojstva.

Jedan od najvećih izazova u elektroispredanju je kompleksna međuzavisnost parametara otopine i procesa. Na primjer, povećanje koncentracije polimera povećava viskoznost, što može zahtijevati povećanje napona za inicijaciju mlaza. Isto tako, povećanje napona može dovesti do smanjenja promjera vlakana kod otopina s niskom viskoznošću, dok kod visoko viskoznih otopina može uzrokovati lomljenje mlaza. Vodljivost i napetost površine dodatno moduliraju ove efekte, a optimalna kombinacija parametara često se određuje eksperimentalno kroz iterativni pristup, koristeći mikroskopsku analizu morfologije vlakana i mjerenje promjera.

Slika 18. Fotografija uzorka, nanovlakna PCL-a nakon elektroispredanja

Slika 18. prikazuje uzorak elektroispredenih nanovlakana PCL-a na kolektorskoj ploči/aluminijskoj foliji.

Parametri procesa uključivali su primijenjeni napon (8 do 17 kV) i udaljenost od vrha igle do kolektora (8 do 17 cm), pri čemu je napon generirao električno polje koje izvlači polimer iz kapljice, a njegova optimalna vrijednost ovisila je o viskoznosti, koncentraciji i vodljivosti otopine.

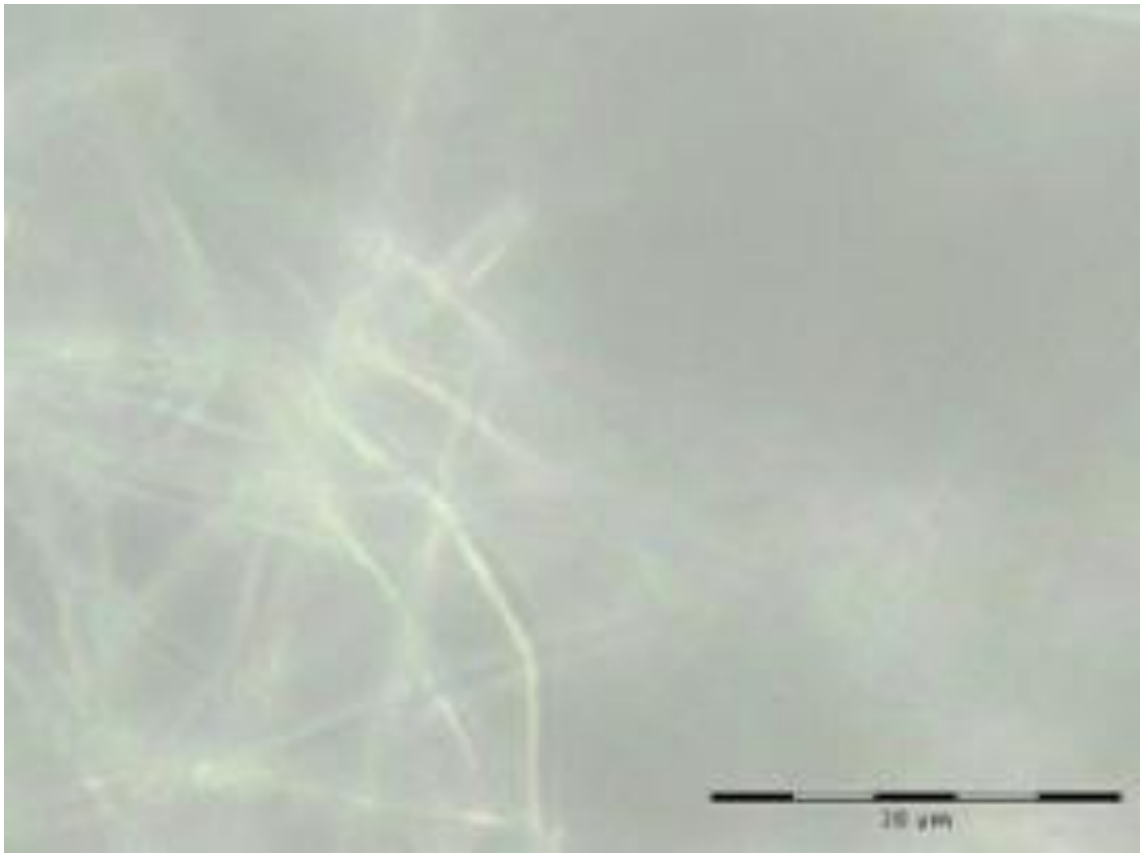
Mnogo je preliminarnih testova završilo neuspješnim rezultatima. Među optimalnim uvjetima detektirano je kako parametri otopine, (viskoznost, koncentracija polimera, molekulska masa, vodljivost i napetost površine) predstavljaju kritične



čimbenike koji trebaju biti optimirani sukladno radnim parametrima instrumenta za elektroispredanje.

Viskoznost utjecala je direktno na otpornost polimernog mlaza kao i na protok i kohezijnu stabilnost; Kod smjesa niže viskoznosti rezultati su bili tvorba kuglica ili fragmentiranih vlakana, dok je otopina previsoka viskoznost otežavala inicijaciju mlaza i povećavala viskozno istezanje, rezultirajući lošim uzorcima.

Slika 19. Elektroispredani materijal pri povećanju od 200 puta slikan optičkim mikroskopom



Slika 19. prikazuje elektroispredeni materijal pri povećanju od 200x slikan optičkim mikroskopom. Nadalje, koncentracija polimera koja direktno utječe na gustoću lanaca i njihovu sposobnost međusobnog ispreplitanja imala je slijedeće učinke: niska koncentracija rezultirala je nekontinuiranim mlazom i nepravilnim morfologijama, dok su previsoke koncentracije povećavale viskoznost i na kraju uzorke vrlo velikih dimenzija.

Prenizak napon spriječavao je nastajanje mlaza, dok su previsoke vrijednosti napona uzrokovale savijanje mlaza, nepravilne promjere i lomljenje vlakana.

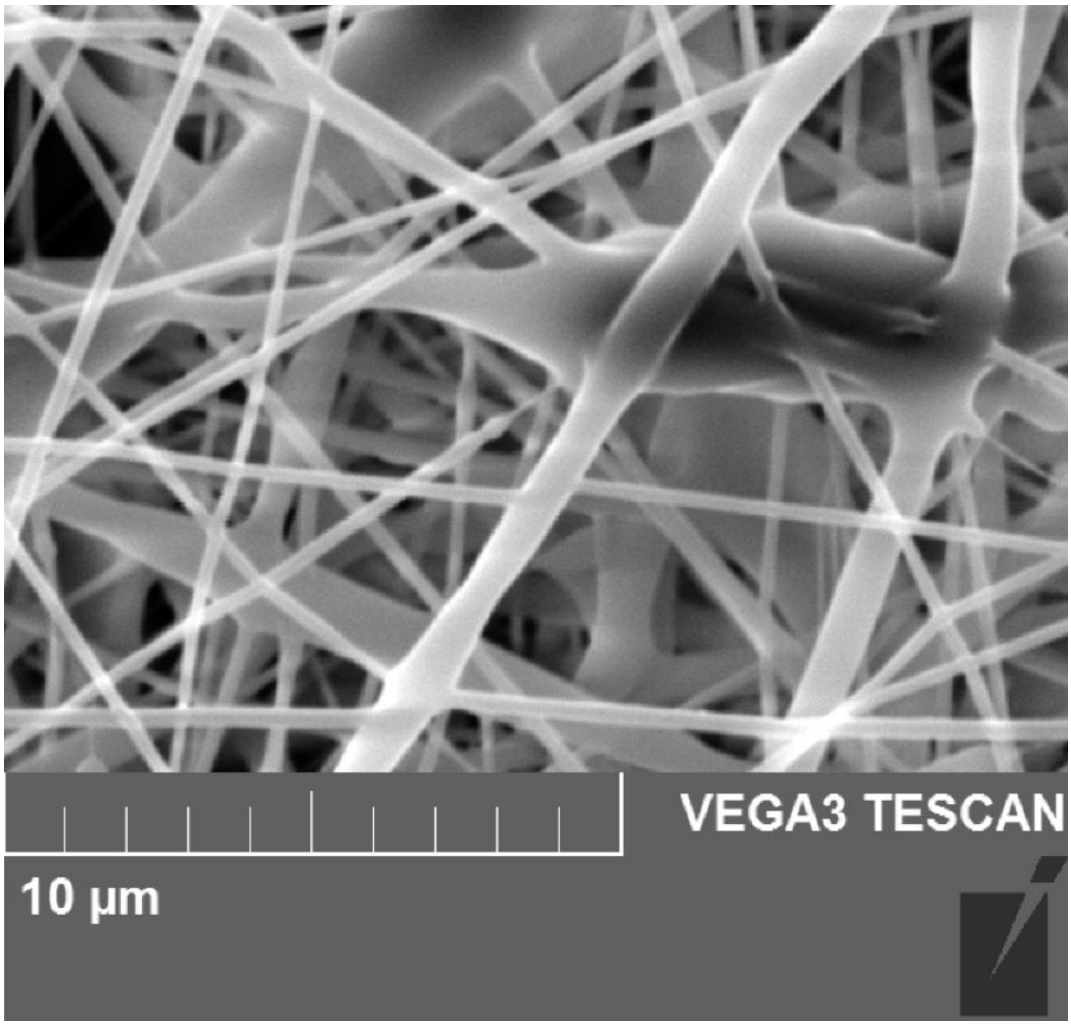
Udaljenost igle do kolektora utjecalo je na vrijeme isparavanja otapala i stabilnost mlaza; prekratka udaljenost rezultirala je ljepljivim i deformiranim vlaknima, dok je preduga udaljenost uzrokovala prekomjerno istezanje. Nadalje, prije nego je uz opremu instalirano kučište, na uzorke je znatan utjecaj imala i ventilacija samog digestora koja je odnosila uzorke sa aluminijskog kolektora i dovodila do kolapsa procesa elektroispredanja.

Svi su procesni parametri međusobno bili povezani, tako da je promjena i varijacija jednog od njih često zahtijevala prilagodbu drugih; pa su preliminarni rezultati i testovi dugo trajali.

Primjerice, povećanje koncentracije polimera povećava viskoznost, što može zahtijevati veći napon za inicijaciju mlaza, dok previsok napon kod visoko viskoznih otopina može destabilizirati proces.

Naši su procesni parametri uspoređeni i sa literaturnim vrijednostima, pri čemu je pokazano slaganje. Primjeri optimizacije uključuju PCL u DCM/DMF sustavu pri koncentraciji 10–15 wt%, naponu 15–20 kV i udaljenosti 12–18 cm, što daje glatka i kontinuirana vlakna promjera 200–800 nm, PLA u kloroform/DMF pri koncentraciji 12–18 wt%, naponu 15–25 kV i udaljenosti 12–20 cm za kontinuirana vlakna promjera 300–900 nm, te PVA u vodenoj otopini pri koncentraciji 8–12 wt%, naponu 12–20 kV i udaljenosti 10–15 cm, što rezultira glatkim i poroznim vlaknima pogodnim za hidrofilne primjene. Kroz pravilnu kontrolu ovih parametara moguće je postići nanovlakna uniformnog promjera, minimalnih defekata i predvidljivih mehaničkih svojstava, što je od ključnog značaja za biomedicinske i industrijske aplikacije. Eksperimentalno podešavanje parametara ostaje standardni pristup, budući da njihova kompleksna međuzavisnost otežava prediktivno modeliranje procesa, dok iterativna optimizacija u kombinaciji s mikroskopskom analizom i mjerenjem promjera omogućava preciznu kontrolu morfologije i funkcionalnosti nanovlakana.

Nadalje je provedena analiza uzorka optičkim mikroskopom. Materijal prikazan na slici 20. homogene je strukture, a vlakna su nasumično orijentirana što je tipično za elektroispredan uzorak pri čemu je zamjetno kako ovaj uzorak nema kugličastih struktura, što znači da su procesni parametri bili dobro podešeni.



Slika 21. SEM analiza uzorka s 20% indometacina

SEM analiza uzorka s 20% indometacina potvrdila je uspješnu sintezu nanometarske mreže biopolimera koja uključuje ovu aktivnu tvar, uzorak je prikazan na slici 21. Dobiveni rezultati ukazuju da elektroispredanje omogućuje stvaranje stabilne i uniformne nanostrukture, pri čemu promjer pojedinih niti iznosi manje od 1 mikrometra. Takva sitna vlakna odražavaju visoku razinu kontrole nad procesom elektroispredanja te omogućuju formiranje površina s velikim omjerom površine i volumena, što je ključno za farmaceutske primjene i kontrolirano otpuštanje lijeka.

Ova početna ispitivanja pružaju čvrstu osnovu za daljnje istraživanje u području elektroispredanja i razvoja nanovlakana koja sadrže farmakološki aktivne tvari. Rezultati sugeriraju mogućnosti dodatne optimizacije parametara otopine i samog procesa kako bi se povećala uniformnost i stabilnost nanostruktura, čime bi se poboljšala učinkovitost otpuštanja indometacina. Osim toga, nanovlaknasta struktura biopolimera pokazuje potencijal za poboljšanu biokompatibilnost, što otvara mogućnosti primjene u ciljanoj dostavi lijeka, ali i u području tkivnog inženjerstva.

Svojstva dobivenih nanovlakana – uključujući morfologiju, poroznost, mehaničku čvrstoću i raspored na kolektoru – mogu se direktno povezati s procesnim parametrima, pa je diskusija i razumijevanje njihovog djelovanja i međusobnih odnosa ključ za kontrolirano proizvodnju nanostrukturiranih materijala koji imaju potencijalnu primjenu u biomedicini, tkivnom inženjeringu, ali i šire (primjerice u filtraciji i senzorima).

Viskoznost otopine utjecala je na stabilnost elektroispredanja. Polimeri s niskom viskoznošću (npr. PVA ili niske koncentracije PCL) imaju tendenciju stvaranja kapljica ili „bead-on-string“ struktura jer kohezijne sile nisu dovoljne za održavanje kontinuiranog mlaza. S druge strane, polimeri visoke viskoznosti, poput polilaktida s visokom molekulskom masom, omogućuju stvaranje vlakana bez defekata, ali mogu otežati početak mlaza. U literaturi, optimalna viskoznost se često nalazi eksperimentalno, a rasponi vrijednosti se kreću od nekoliko stotina do nekoliko tisuća centipoise, ovisno o polimeru i otapalu. Na primjer, viskoznost PCL otopine u DCM/DMF sustavu od 600–1000 cP daje glatka i kontinuirana vlakna promjera 200–800 nm.

Koncentracija polimera direktno je utjecala na gustoću lanaca u otopini i njihovu sposobnost međusobnog ispreplitanja, što je ključno za stabilnost mlaza. Niska koncentracija može rezultirati fragmentiranim mlazom i tvorbom

kuglica, dok previsoka koncentracija povećava viskoznost i stvara prekomjerno zgužvana ili neproporcionalna vlakna. Kritična koncentracija polimera predstavlja prag iznad kojeg kontinuirani mlaz može nastati. Primjeri iz literature pokazuju da 10–15 wt% PCL u DCM/DMF sustavu daje stabilna vlakna, dok su niže koncentracije problematične. Kod hidrofilnih polimera poput PVA, optimalne koncentracije često se kreću između 8–12 wt%.

Molekulska masa polimera određuje dužinu lanaca i njihovu sposobnost ispreplitanja. Polimeri s višom molekulskom masom imaju veću viskoznost pri istoj koncentraciji, što olakšava formiranje stabilnog mlaza. Niski molekulski polimeri često zahtijevaju povećanu koncentraciju ili miješanje s drugim polimerima kako bi se postigla potrebna kohezijna snaga. U studijama se pokazalo da PLA s molekulskom masom od 100–150 kDa stvara kontinuirana vlakna, dok PLA od 20–40 kDa pokazuje fragmentirane strukture.

Vodljivost otopine određuje sposobnost prijenosa naboja i stabilnost mlaza. Otopine s niskom vodljivošću zahtijevaju veći primijenjeni napon, što može destabilizirati mlaz i stvoriti nepravilna vlakna. Previsoka vodljivost, primjerice zbog dodavanja soli, može uzrokovati prekomjernu ekstruziju i savijanje mlaza. Vodljivost se često podešava dodavanjem aditiva ili korištenjem otapala s različitom dielektričnom konstantom. Na primjer, dodavanje male količine LiCl u PEO/DMSO otopinu povećava vodljivost, poboljšava stabilnost mlaza i smanjuje tvorbu kuglica.

Napetost površine utječe na inicijaciju mlaza i formiranje Taylorovog stošca. Visoka napetost površine sprječava deformaciju kapljice i usporava proces, dok niska napetost olakšava formiranje mlaza, ali može rezultirati raspršivanjem i tvorbom poroznih vlakana. Kontrola napetosti površine omogućava dobivanje glatkih i kontinuiranih vlakana, a surfaktanti poput Tween 80 ili SDS se često koriste za smanjenje napetosti površine i poboljšanje morfologije.

Procesni parametri koji su povezani sa parametrima otopine određuju električnu, mehaničku i aerodinamičku kontrolu mlaza. Najvažniji su primijenjeni napon i udaljenost od vrha igle do kolektora, no drugi parametri poput protoka otopine i brzine kolektora također igraju značajnu ulogu.

Napon generira električno polje koje izvlači polimer iz vrha igle. Nizak napon dovodi do neuspješnog pokretanja mlaza ili formiranja kapljica, dok previsok napon može uzrokovati prekomjernu disipaciju naboja, savijanje mlaza i nepravilne promjere vlakana. Optimalni napon ovisi o viskoznosti i vodljivosti otopine, te se eksperimentalno određuje za svaki sustav. Primjeri uključuju 15–25 kV za PCL u DCM/DMF sustavu i 12–20 kV za PVA u vodenoj otopini.

Udaljenost određuje vrijeme isparavanja otapala i stabilnost mlaza. Prekratka udaljenost može rezultirati ljepljivim i deformiranim vlaknima, dok preduga udaljenost može uzrokovati lomljenje mlaza i prekomjerno istezanje. Idealna udaljenost omogućava dovoljno vremena za formiranje kontinuiranih vlakana i kontroliranu disipaciju naboja. Rasponi u literaturi variraju:

- **PCL (Polikaprolakton)**: Optimalna koncentracija 10–15 wt% u DCM/DMF, napon 15–20 kV, udaljenost 12–18 cm. Rezultat: glatka vlakna 200–800 nm bez kuglica.
- **PLA (Polilaktid)**: Optimalna koncentracija 12–18 wt% u chloroform/DMF, napon 15–25 kV, udaljenost 12–20 cm. Rezultat: kontinuirana vlakna, promjer 300–900 nm, visoka mehanička čvrstoća.
- **PVA (Polivinil alkohol)**: 8–12 wt% u vodi, napon 12–20 kV, udaljenost 10–15 cm. Rezultat: glatka i porozna vlakna pogodna za hidrofilne aplikacije.
- **Poliglikolid i poliuretani**: zahtijevaju dodatno podešavanje otapala i dodataka za optimizaciju viskoznosti i vodljivosti.

Temeljem dobivenih rezultata te literaturnog pregleda može se zaključiti kako elektroispredanje predstavlja inovativnu i široko istraživanu tehniku za proizvodnju nanovlakana s kontroliranom morfologijom, što je od izuzetnog značaja u području tkivnog inženjerstva.

Tkivno inženjerstvo je multidisciplinarno područje koje spaja biologiju, inženjerstvo materijala i medicinu s ciljem razvoja biokompatibilnih struktura koje mogu nadomjestiti, popraviti ili poboljšati funkciju oštećenog tkiva.

Tradicionalne metode proizvodnje matriksa, poput lijevanja, presovanja ili poroznog sinteriranja, često ne mogu reproducirati složenu mikro- i nanostrukturu ekstracelularnog matriksa (ECM), što je ključno za proliferaciju, diferencijaciju i migraciju stanica. U tom kontekstu, elektroispredanje se ističe jer omogućuje stvaranje vlakana s promjerom u rasponu od nekoliko stotina nanometara do nekoliko mikrometara, što je približno dimenzijama prirodnog ECM-a, pružajući fizičku potporu i biološke signale potrebne za rast i organizaciju stanica.

Nanovlaknaste strukture dobivene elektroispredanjem mogu se koristiti kao scaffoldovi (potporne matrice) za različite vrste tkiva, uključujući kožu, kosti, hrskavicu, krvne žile, živčano tkivo i srčani mišić. Jedna od ključnih prednosti ovih nanovlakana je visoka omjer površine i volumena, koji omogućuje učinkovitu adsorpciju proteina, vezanje faktora rasta i interakciju s stanicama. Površinska morfologija nanovlakana također omogućuje modulaciju ponašanja stanica, uključujući orijentaciju, migraciju i diferencijaciju. Na primjer, poravnata i orijentirana vlakna često potiču usmjereni rast živčanih stanica ili mišićnih vlakana, dok nasumično orijentirana vlakna bolje imitiraju tridimenzionalnu strukturu kože i potiču proliferaciju fibroblasta.

Materijali korišteni u elektroispredanju za tkivno inženjerstvo uključuju prirodne i sintetske polimere. Prirodni polimeri, poput kolagena, želatine, hitina, hijaluronske kiseline i svile, odlikuju se izvrsnom biokompatibilnošću, biološkom aktivnošću i sposobnošću interakcije s stanicama. Međutim, oni često pokazuju ograničenu mehaničku čvrstoću i kontrolu nad stopom razgradnje. Sintetski polimeri, poput polilaktida (PLA), polikaprolaktona (PCL), poliglikolida (PGA) i njihovih

kopolimera (PLGA), nude veću mehaničku stabilnost i mogućnost preciznog prilagođavanja stope degradacije, no njihova biokompatibilnost može biti manja u usporedbi s prirodnim polimerima. Zbog toga se često koriste kombinacije prirodnih i sintetskih polimera, stvarajući hibridne scaffoldove koji udružuju prednosti oba tipa materijala.

Elektroispredanje također omogućuje kontrolu poroznosti i rasporeda vlakana unutar scaffolda, što je ključno za transport hranjivih tvari, kisika i metaboličkih produkata kroz tkivo. Poroznost se može modulirati parametrima otopine, poput viskoznosti i koncentracije polimera, te procesnim parametrima, uključujući napon, udaljenost igle do kolektora i protok otopine. Optimalna poroznost doprinosi proliferaciji stanica i invaziji u scaffold, čime se poboljšava integracija s okolnim tkivom. Nadalje, orijentacija vlakana može se kontrolirati primjenom rotirajućih bubnjeva ili elektrospinanih uzoraka s uzorkovanjem električnog polja, što omogućuje proizvodnju scaffoldova s ciljanom mikrostrukturom, posebno važnih za funkcionalne rekonstrukcije mišića i živaca.

Primjena elektroispredanja u regeneraciji kože predstavlja jedan od najintenzivnije istraživanih područja. Nanovlaknaste membrane mogu poslužiti kao privremeni pokrovni sloj koji štiti ranu, sprječava gubitak tekućina i mikroorganizama te istovremeno potiče proliferaciju keratinocita i fibroblasta. Scaffoldovi se mogu obogatiti biološki aktivnim molekulama, poput faktora rasta, antibakterijskih agenasa ili peptida koji stimuliraju angiogenezu, čime se poboljšava kvalitetna regeneracija i smanjuje vrijeme cijeljenja rana. Klinička istraživanja pokazuju da elektroispredane membrane od PLA, PCL ili hibridnih PLA/želatina scaffoldova značajno ubrzavaju proces epitelizacije i smanjuju ožiljke u usporedbi s konvencionalnim zavojima.

U regeneraciji kostiju i hrskavice, elektroispredani scaffoldovi služe kao matrica za osteogene i hondrogene stanice. Nanovlakna mogu se dodatno mineralizirati kalcijem i fosfatom, što stvara strukture nalik prirodnoj kosti, poboljšavajući mehanička svojstva i osteointegraciju. Kontrola poroznosti omogućuje ulazak krvnih žila i transport hranjivih tvari, što je ključno za stvaranje funkcionalnog tkiva. Kod hrskavice, orijentirana vlakna mogu poslužiti kao vodič za proliferaciju hondrocita, dok hibridni scaffoldovi kombinirajući PCL i prirodne proteine stvaraju optimalnu kombinaciju čvrstoće i bioaktivnosti.

Elektroispredanje također ima ključnu ulogu u regeneraciji živčanog tkiva. Orijentirana nanovlakna mogu poslužiti kao fizički vodič za rast aksona, potičući brzinu i usmjerenost regeneracije perifernih živaca. Scaffoldovi se često obogaćuju neurotrofnim faktorima ili bioaktivnim molekulama koje stimuliraju diferencijaciju stanica Schwanna i aksonalni rast. Eksperimentalna istraživanja pokazuju da elektroispredani PCL i PLA scaffoldovi, posebno u kombinaciji s kolagenom ili lamininom, značajno poboljšavaju funkcionalni oporavak nakon ozljeda perifernih živaca kod životinjskih modela.

U regeneraciji vaskularnog tkiva, elektroispredani scaffoldovi koriste se za proizvodnju umjetnih krvnih žila i vaskularnih graftova. Orijentirana vlakna mogu usmjeriti proliferaciju endotelnih stanica i glatkih mišićnih stanica, dok kontrola poroznosti i debljine zida omogućuje optimalnu perfuziju i mehaničku stabilnost. Biomolekularna modifikacija vlakana, primjerice adsorpcijom faktora rasta ili peptida za prianjanje stanica, dodatno poboljšava biokompatibilnost i integraciju s postojećim vaskularnim tkivom.

Primjena elektroispredanja u tkivnom inženjerstvu ne ograničava se samo na fiksne scaffoldove; nanovlakna se također mogu koristiti u proizvodnji fleksibilnih membrana, obloga za injektabilne sustave i nositelja lijekova. Sustavi s kontroliranim otpuštanjem lijekova ili faktora rasta omogućuju lokalnu terapiju i stimulaciju regeneracije, čime se smanjuju nuspojave i povećava učinkovitost tretmana. Elektroispredanje omogućuje stvaranje vlakana različite debljine i sastava unutar istog scaffolda, što daje višeslojnu strukturu s funkcionalnim zonama, primjerice vanjski sloj otporan na mikroorganizme, srednji sloj za proliferaciju stanica i unutarnji sloj bogat faktorima rasta.

Iako elektroispredanje nudi značajne prednosti u tkivnom inženjerstvu, postoje i izazovi u prijenosu iz laboratorija u kliničku praksu. Kontrola sterilnosti, reproduktivnost procesa, skalabilnost proizvodnje i dugoročna stabilnost scaffoldova predstavljaju ključne prepreke. Osim toga, izbor otapala i polimera mora biti pažljivo prilagođen kako bi se osigurala potpuna eliminacija toksina i održala biokompatibilnost. Multidisciplinarni pristup, uključujući biologe, kemičare, inženjere materijala i kliničare, ključan je za uspješnu implementaciju elektroispredanih scaffoldova u kliničke protokole.

Elektroispredanje stoga predstavlja tehnologiju budućnosti u razvoju tkivnog inženjerstva jer ono omogućuje proizvodnju nanovlakana s kontroliranom morfologijom, poroznošću i biokompatibilnošću, te omogućuje integraciju bioaktivnih molekula i stvaranje višeslojnih struktura prilagođenih specifičnim tipovima tkiva. Nadalje, primjena novih materijala u regeneraciji kože, kostiju, hrskavice, živaca i vaskularnog tkiva pokazuje značajan potencijal za poboljšanje kliničkih ishoda liječenja.

Slijedeći su koraci u istraživanju optimizacija sastava materijala i procesa, primjenu hibridnih polimera, funkcionalizaciju vlakana te skalabilne i sterilne proizvodne metode, čime će elektroispredanje postati ključna tehnologija za proizvodnju naprednih biomedicinskih materijala.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati rada potvrdili su hipotezu da je moguće prirediti elektroispredene materijale sa i bez dodavanja indometacina, lijeka za reumatodni artritis. Postupak elektroispredanja je uspješno proveden nakon mnogobrojnih

preliminarnih eksperimenata, a dobiveni su uzorci biopolimera polikaprolaktona koji sadrže indometacin kao farmakološki aktivnu tvar.

Kontrola parametara otopine i procesa u elektroispredanju omogućila je precizno oblikovanje nanovlakana. Viskoznost, koncentracija i molekulska masa polimera definirali su stabilnost mlaza i morfologiju vlakana, dok su vodljivost i napetost površine modulire nastajanje potrebnog Taylorovog stošca. Parametri procesa, primijenjeni napon i udaljenost igle do kolektora, direktno su utjecali na vrijeme isparavanja otapala, stabilnost mlaza i konačne dimenzije vlakana. Optimalna kombinacija ovih parametara omogućila je dobivanje uzoraka nanovlakana s uniformnim promjerom, minimalnim defektima i predvidljivim mehaničkim svojstvima, što je ključno za biomedicinske i industrijske primjene.

Eksperimentalno podešavanje i iterativna optimizacija parametara predstavljaju ključni sljedeći korak u istraživanjima, s obzirom na složenu međuzavisnost parametara koja otežava dobivanje željenih materijala bez preciznog uvida u optimalne vrijednosti procesnih uvjeta. Daljnjim usavršavanjem parametara elektroispredanja očekuje se postizanje učinkovitijih i kontroliranijih procesa, omogućujući izravnu manipulaciju svojstvima biomedicinski aktivnih materijala i otvarajući nove mogućnosti u dizajnu naprednih funkcionalnih sustava.

6. LITERATURA

1. Hong J, Yeo M, Yang GH, Kim G. (2019). Cell-Electrospinning and Its Application for Tissue Engineering. International Journal of Molecular Sciences, 20(24), 6208. doi:10.3390/ijms20246208.
2. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. Tissue Eng. 2006, 12, 1197–1211. doi:10.1089/ten.2006.12.1197
3. Yarin, AL, Koombhongse S, Reneker DH. Bending instability in electrospinning of nanofibers. J. Appl. Phys. 2001, 89, 3018–3026. doi:10.1063/1.1333035
4. Chronakis, I.S. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process—A review. J. Mater. Process Technol. 2005, 167, 283–293. doi:10.5004/dwt.2020.25821
5. Braghirolli DI, Steffens D, Pranke P. Electrospinning for regenerative medicine: A review of the main topics. Drug Discov. Today 2014, 19, 743–753. doi:10.1016/j.drudis.2014.03.024
6. Schlie-Wolter S, Ngezahayo A, Chichkov BN. The selective role of ECM components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication in vitro. Exp. Cell Res. 2013, 319, 1553–1561. doi:10.1016/j.yexcr.2013.03.016
7. Jiyao Xing, Miao Zhang, Xinlin Liu, Chao Wang, Nannan Xu, Dongming Xing, Multi-material electrospinning: from methods to biomedical applications, Materials Today Bio, Volume 21, 2023, 100710, ISSN 2590–0064, doi:10.1016/j.mtbio.2023.100710
8. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Biotechnol. Adv. 2010, 28, 325–347. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
9. Zulkifli, M.Z.A.; Nordin, D.; Shaari, N.; Kamarudin, S.K. Overview of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. Polymers 2023, 15, 2418. doi:10.3390/polym15112418.
10. Li T, Sun M, Wu S. State-of-the-art review of electrospun gelatin-based nanofiber dressings for wound healing applications. Nanomaterials. 2022;12(5):784. doi:10.3390/nano12050784.
11. Jayakumar R, Prabaharan M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Int Wound J. 2011;8(2):166–81. doi:10.1111/j.1742–481X.2011.00772.x.
12. Zhou C, Yu M, Yang H, Zhang L, Wang C, Yu D-G. Silk fibroin-based biomaterials for biomedical applications: A review. Bioengineering. 2024;11(3):123. doi:10.3390/bioengineering11030123.
13. Gautam S, Dinda AK, Mishra NC. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2013;33(3):1228–35. doi:10.1016/j.msec.2012.12.022.
14. Campiglio CE, Contessi Negrini N, Farè S, Draghi L. Cross-linking strategies for electrospun gelatin scaffolds. Materials (Basel). 2019;12(15):2476. doi:10.3390/ma12152476.
15. Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angew Chem Int Ed Engl. 2005;44(22):3358–93. doi:10.1002/anie.200460587.
16. Torres-Giner S, Pérez-Masiá R, Lagaron JM. A review on electrospun polymer nanostructures as advanced materials for food and biomedical applications. TrAC Trends Analyt Chem. 2016;84:48–59. doi:10.1016/j.trac.2016.01.020.
17. Kontturi E, Laaksonen P, Linder MB, Nonappa, Gröschel AH, Rojas OJ, Ikkala O. Advanced materials through assembly of nanocelluloses. Adv Mater. 2018;30(24):1703779. doi:10.1002/adma.201703779.
18. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog Polym Sci. 2006;31(7):603–32. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
19. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. Adv Drug Deliv Rev. 2010;62(1):3–11. doi:10.1016/j.addr.2009.09.004.
20. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011;9(7):857–79. doi:10.1586/eri.11.59.

21. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. Adv Drug Deliv Rev. 2001;52(2):105–15. doi:10.1016/S0169–409X(01)00189–2.
22. Geng X, Kwon OH, Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. Biomaterials. 2005;26(27):5427–32. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.066.
23. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. Biomaterials. 2003;24(3):401–16. doi:10.1016/S0142–9612(02)00353–8.
24. Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. Nat Protoc. 2011;6(10):1612–31. doi:10.1038/nprot.2011.379.
25. Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. Biomaterials. 2006;27(36):6064–82. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.07.008.
26. Rouse JG, Van Dyke ME. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. Materials. 2010;3(2):999–1014. doi:10.3390/ma3020999.
27. Hill P, Brantley H, Van Dyke M. Some properties of keratin biomaterials: Kerateines. Biomaterials. 2010;31(4):585–93. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.076.
28. Shanmugam K, Sivasubramanian S, Sethuraman S, Krishnan UM. Electrospun keratin scaffolds for tissue engineering: A biomimetic approach. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;72:123–9. doi:10.1016/j.msec.2016.11.050.
29. Espíndola-González A, Martínez-Hernández AL, Fernández-Escobar F, Castaño VM, Brostow W, Datashvili T, Velasco-Santos C. (2011). Natural-Synthetic Hybrid Polymers Developed via Electrospinning: The Effect of PET in Chitosan/Starch System. International Journal of Molecular Sciences, 12(3), 1908–1920. doi:10.3390/ijms12031908.
30. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials. 2008;29(13):1989–2006. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
31. Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. J Biomed Mater Res. 2002;60(4):613–21. doi:10.1002/jbm.10167.
32. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. Biomaterials. 2000;21(23):2335–46. doi:10.1016/S0142–9612(00)00101–0.
33. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. Polymers (Basel). 2011;3(3):1377–97. doi:10.3390/polym3031377.
34. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. Biomaterials. 1996;17(2):93–102. doi:10.1016/0142–9612(96)85754–1.
35. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. Prog Polym Sci. 2010;35(10):1217–56. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
36. Dash TK, Konkimalla VB. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. J Control Release. 2012;158(1):15–33. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.064.
37. Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Ramakrishna S. Electrospun poly(ε-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Biomaterials. 2008;29(34):4532–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.08.007.
38. Auras R, Lim LT, Selke SEM, Tsuji H, editors. Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications. Hoboken (NJ): Wiley; 2010.
39. Drumright RE, Gruber PR, Henton DE. Polylactic acid technology. Adv Mater. 2000;12(23):1841–6. doi:10.1002/1521–4095(200012)12:23<1841::AID-ADMA1841>3.0.CO;2-E.
40. Guelcher SA. Biodegradable polyurethanes: Synthesis and applications in regenerative medicine. Tissue Eng Part B Rev. 2008;14(1):3–17. doi:10.1089/teb.2007.0152.
41. Skarja GA, Woodhouse KA. Structure–property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. J Appl Polym Sci. 2000;75(12):1522–34. doi:10.1002/(SICI)1097–4628(20000321)75:12<1522::AID-APP6>3.0.CO;2-W.
42. Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, Wagner WR. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas for soft tissue engineering. Biomacromolecules. 2004;5(4):1474–86. doi:10.1021/bm049914z.
43. Reneker D H, Kataphinan W, Theron A, Zussman E and Yarin A L 2002 Polymer 43 6785 doi:10.1016/S0032–3861(02)00595–5.
44. Venugopal J, Low S, Choon AT, Ramakrishna S. Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007;84(1):34–48. doi:10.1002/jbm.b.30841.
45. Fomby P, Cherlin AJ, Hadjizadeh A, Doillon CJ, Sueblinvong V, Weiss DJ, Bates JHT, Gilbert T, Liles WC, Lutzk, C, et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. Ann. Am. Thorac. Soc. 2010, 12, 181–204.
46. Yang Z, Peng H, Wang W, Liu T. Crystallization behavior of poly(ε-caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites. J. Appl. Polym. Sci. 2010, 116, 2658–2667.
47. Varabhas JS, Chase GG, Reneker D. 2008 Polymer 49 4226. doi:10.1016/j.polymer.2008.07.043

48. Hasegawa M, Isogai A. A novel method for introducing carboxyl groups into polysaccharide nanofibers by using acrylic acid. Biomacromolecules. 2011;12(7):2483–9. doi:10.1021/bm200409x.
49. Li X, Kanjwal MA, Lin L, Chronakis IS. Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. Colloids Surf B Biointerfaces. 2013;103:182–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.09.038.
50. Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005;72(1):156–65. doi:10.1002/jbm.b.30128.
51. Frenot A, Chronakis IS. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2003;8(1):64–75. doi:10.1016/S1359–0294(03)00004–9.
52. Theron A, Zussman E, Yarin AL. Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. Nanotechnology. 2001;12(3):384–90. doi:10.1088/0957–4484/12/3/329.
53. Li Z, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? Adv Mater. 2004;16(14):1151–70. doi:10.1002/adma.200400719.
54. Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. Polymer. 2002;43(16):4403–12. doi:10.1016/S0032–3861(02)00275–6.
55. Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. Angew Chem Int Ed Engl. 2007;46(30):5670–703. doi:10.1002/anie.200604646.
56. Casper CL, Stephens JS, Tassi NG, Chase DB, Rabolt JF. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. Macromolecules. 2004;37(2):573–8. doi:10.1021/ma0351975.
57. Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, Kaplan DL. Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). Biomacromolecules. 2002;3(6):1233–9. doi:10.1021/bm025581u.
58. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. Biomaterials. 2005;26(2):147–55. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.047.
59. Hong SJ, Zhang X, Sun Z, Zeng T. The potential health risks of N,N-dimethylformamide: An updated review. J Appl Toxicol. 2024;44(11):1637–46. doi:10.1002/jat.4590.
60. Sridhar R, Lakshminarayanan R, Madhaiyan K, Barathi VA, Limh KHC, Ramakrishna S. Electrosprayed nanoparticles and electrospun nanofibers based on natural materials: Applications in tissue regeneration, drug delivery and pharmaceuticals. Chem. Soc. Rev. 2015, 44, 790–814. doi:10.1039/c4cs00226a
61. Goh YF, Shakir I, Hussain R. Electrospun fibers for tissue engineering, drug delivery, and wound dressing. J. Mater. Sci. 2013, 48, 3027–3054. doi:10.1007/s10853-013-7145-8
62. Chew S, Wen Y, Dzenis Y, Leong K. The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. Curr. Pharm. Des. 2006, 12, 4751–4770. doi:10.2174/138161206779026326
63. Suresh S, Becker A, Glasmacher B. Impact of Apparatus Orientation and Gravity in Electrospinning-A Review of Empirical Evidence. Polymers (Basel). 2020 Oct 22;12(11):2448. doi:10.3390/polym12112448. PMID: 33105879; PMCID: PMC7690589.
64. Ton Peijs, 6.7 Electrospun Polymer Nanofibers and Their Composites, Editor(s): Peter W.R. Beaumont, Carl H. Zweben, Comprehensive Composite Materials II, Elsevier, 2018, Pages 162–200, ISBN 9780081005347, doi:10.1016/B978–0-12–803581–8.10025–6.
65. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science. 1993;260(5110):920–6. doi:10.1126/science.8493529.
66. Casper CL, Yamaguchi N, Kiick KL, Rabolt JF. Functionalizing electrospun fibers with biologically relevant macromolecules. Biomacromolecules. 2005;6(4):1998–2007. doi:10.1021/bm049200e.
67. Lee J, Tae G, Kim YH, Park IS, Kim SH, Kim SH. The effect of controlled release of PDGF-BB from heparin-conjugated electrospun PCL/gelatin scaffolds on cellular bioactivity and infiltration. Biomaterials. 2013;34(7):1898–907. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.11.034.
68. Jia X, Liau LL, Saim AB, Yang Y, Idrus RB. Electrospun collagen nanofibers and their applications in skin tissue engineering. Tissue Eng Regen Med. 2017;14(6):699–718. doi:10.1007/s13770–017–0072–2.
69. Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. Electrospun nanofibrous scaffolds for tissue engineering: A review of current approaches. J Biomed Mater Res A. 2013;101(11):2893–905. doi:10.1002/jbm.a.34549.
70. Zhang W, Weng T, Li Q, Jin R, You C, Wu P, Shao J, Xia S, Yang M, Han C, Wang X. Applications of Poly(caprolactone)-based Nanofibre Electrospun Scaffolds in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Curr Stem Cell Res Ther. 2021;16(4):414–442. doi:10.2174/1574888X15666201014145703.
71. Smolen JS, Steiner G, Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 2, 473–488. doi:10.1038/nrd1109
72. Nehar P, Abdelrahman Z, et al. Autoimmune rheumatic diseases: one or many diseases? J Transl Autoimmunity. 2021;4:100094. doi:10.1016/j.jtauto.2021.100094.
73. Yuan F, Quan LD, Cui L, Goldring SR, Wang D. Development of macromolecular prodrug for rheumatoid arthritis. Adv Drug Deliv Rev. 2012;64(12):1205–19. doi:10.1016/j.addr.2012.04.006.

74. Tan YK, Conaghan PG. Imaging in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2018;77(1):98–105. doi:10.1136/annrheumdis-2017–211585.
75. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. Arthritis Rheum. 2012;64(6):1697–707. doi:10.1002/art.34453.
76. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. Lancet. 2019;393(10182):1745–59. doi:10.1016/S0140–6736(19)30417–9.
77. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. Int J Tissue React. 1998;20(1):3–15. PMID: 9561441
78. Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. Basel: Springer; 2007. p. 55–73. doi:10.1007/1-4020-5688-5_1
79. Jain R, Mahajan A, Singh R, Mittal S, Batra A. Efficacy of indomethacin in crystal-induced arthritis: a clinical update. Clin Rheumatol. 2013;32(9):1329–35. doi:10.1007/s10067–013–2263–2.
80. Sweetman SC, editor. Martindale: The Complete Drug Reference. 36th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009. p. 58–60. ISBN 978 0 85369 840 1, ISSN 0263-5364.