



Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

**POLISAHARIDNI KOMPOZITI KOT NOVI MATERIALI ZA  
KOSTNE IMPLANTATE/POLYSACCHARIDE COMPOSITES AS  
BONE TISSUE IMPLANTS**

(Raziskovalna naloga)

Področje: Kemija ali kemijska tehnologija

Avtorica:

Kaja Bedernjak

Mentorici:

Mateja Godec, prof., dr. Gabrijela Horvat

Ljutomer, april 2022

## Kazalo vsebine

Zahvala .....	6
Povzetek.....	7
Abstract.....	8
1 Uvod.....	9
2 Teoretični del.....	11
2.1 Kostni implantati.....	11
2.2 Aerogeli .....	11
2.3 Kserogeli .....	13
2.4 Polimlečna kislina .....	13
2.5 Etil celuloza.....	14
2.6 Indometacin.....	15
3 Eksperimentalni del .....	16
3.1 Kemikalije .....	16
3.2 Laboratorijski inventar in aparature .....	16
3.3 Priprava PLA-EC kompozita .....	18
3.4 Priprava PLA-EC z indometacinom.....	19
3.5 Sušenje kompozitov na zraku .....	20
3.6 Superkrično sušenje kompozitov .....	20
3.7 Karakterizacija .....	21
3.8 Nabrekanje .....	21
3.9 Vsebnost indometacina .....	24
3.10 Sproščanje indometacina .....	24
4 Rezultati .....	25
4.1 Karakterizacija .....	25
4.2 Nabrekanje in razpad PLA-EC .....	25

4.2.1 Kserogeli .....	25
4.2.2 Aerogeli.....	26
4.2.3 Primerjava.....	27
4.3 Vsebnost indometacina .....	29
4.4 Sproščanje indometacina .....	29
5 Zaključek.....	31
6 Viri in literatura.....	33
6.1 Viri slik.....	34

## Kazalo slik

Slika 1: Grafični prikaz raziskovalne naloge .....	10
Slika 2: Načini priprave končnega materiala iz mokrega gela .....	12
Slika 3: Fazni diagram ogljikovega dioksida .....	12
Slika 4: Sinteza PLA .....	14
Slika 5: Etil celuloza .....	15
Slika 6: Raztopina etil celuloze v etanolu med mešanjem.....	18
Slika 7: Raztopina polimlečne kisline na magnetnem mešalu .....	18
Slika 8: EC/EtOH na ultrazvočni kopeli .....	19
Slika 9: Kompozita v etanolu in v nasičeni raztopini indometacina .....	20
Slika 10: Sušenje kompozita na zraku po enem dnevu: a) kompozit z indometacinom, b) kompozit brez indometacina .....	20
Slika 11: Kompozit posušen superkritično .....	21
Slika 12: Simulirana prebavna tekočina.....	22
Slika 13: Vodna kopel.....	23
Slika 14: Sproščanje indometacina na USP II napravi.....	24
Slika 15: FE-SEM fotografije EC-PLA pri: a) nizki povečavi in b) visoki povečavi.....	25

## Kazalo grafov

Graf 1: Povprečje razpada pri treh kserogelih v odvisnosti od časa .....	26
Graf 2: Povprečje razpada pri treh aerogelih v odvisnosti od časa.....	27
Graf 3: Razpad - primerjava povprečij v odvisnosti od časa .....	28
Graf 4: Sproščanje indometacina v odvisnosti od časa .....	30

## Kazalo tabel

Tabela 1: Seznam in količina kemikalij, ki smo jih uporabili za pripravo SBF. ....	22
Tabela 2: Primerjava količine ionov v SBF in v krvni plazmi .....	23
Tabela 3: Povprečje razpada pri treh kserogelih.....	26
Tabela 4: Povprečje razpada pri treh aerogelih.....	27
Tabela 5: Vsebnost indometacina .....	29
Tabela 6: Vsebnost indometacina po treh dneh.....	29
Tabela 7: Sproščanje indometacina .....	30

## **ZAHVALA**

Mentoricama dr. Gabrijeli Horvat in profesorici Mateji Godec se zahvaljujem za pomoč pri izvedbi eksperimentov in meritev ter pri pisanju raziskovalne naloge.

Prav tako se zahvaljujem Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru, ki mi je za raziskovalne namene omogočila uporabo laboratorijev in priskrbelo potrebne materiale, ter profesorici Tanji Bigec za lektoriranje raziskovalne naloge.

## **POVZETEK**

V tej raziskovalni nalogi smo pripravili kompozitne materiale iz polimlečne kisline ter etil celuloze po dveh različnih metodah sušenja. Pripravljene materiale smo karakterizirali z vrstičnim mikroskopom, da smo ugotovili njihovo mikrostrukturo ter poroznost. Preverili smo tudi razpad teh biomaterialov v simulirani prebavni tekočini in ugotovili, da se materiali v simulirani prebavni tekočini obnašajo podobno, ne glede na metodo sušenja. V materiale smo vezali modelno učinkovino indometacin, da bi preverili njeno sproščanje iz materiala. Ugotovili smo, da se indometacin uspešno vgradi v material ter se sprošča daljše časovno obdobje.

Potrebne so še raziskave materialov na in-vitro celičnih linijah, vendar dobljeni rezultati kažejo na velik potencial takih materialov za kostne implantate.

Ključne besede: polimlečna kislina, etil celuloza, aerogel, kserogel, kostni implantati



## **ABSTRACT**

In this research, composite scaffold materials for their potential application for medical implants were prepared. Scaffolds were prepared from polylactic acid and ethyl cellulose and then either dried at ambient conditions or super critically dried. Scaffolds were characterized by scanning electron microscope to investigate their porous structure. The presence of large macropores but also the presence of small mesopores in the range of a few tens of nanometers were confirmed. Such structure is highly favorable for cell adhesion and proliferation. The degradation of prepared scaffolds was investigated in-vitro in simulated body fluid. Scaffolds, dried by different methods, showed similar degradation. Indomethacin, a model substance, was incorporated into the scaffold in order to investigate its dissolution profile in-vitro. Indometacin was successfully incorporated into the scaffold and its controlled release was confirmed over one month. Such results show great potential for those materials to be used as bone implants.

Key words: polylactic acid, ethyl cellulose, aerogel, xerogel, bone implants

# 1 UVOD

V lanskem šolskem letu sem na internetu zasledila članek dr. Gabrijele Horvat o aerogelih, materialih, ki imajo edinstveni lastnosti. Ker so me aerogeli pritegnili, sem se odločila da bodo tudi tema moje raziskovalne naloge.

Zaradi staranja prebivalstva in povečanega števila poškodb, ki so večinoma posledica športne aktivnosti in avtomobilskih nesreč, se je v zadnjih letih potreba po ortopedskih implantatih zelo povečala. Danes za kostne implantate večinoma uporabljajo kovino, keramiko in steklo, a so ti materiali lahko slabše vzdržljivi, telo pa jih lahko tudi zavrne. Tako so se pojavile ideje, da bi take materiale nadomestili z biorazgradljivimi in biokompatibilnimi materiali, s katerimi bi se takim nevšečnostim izognili.

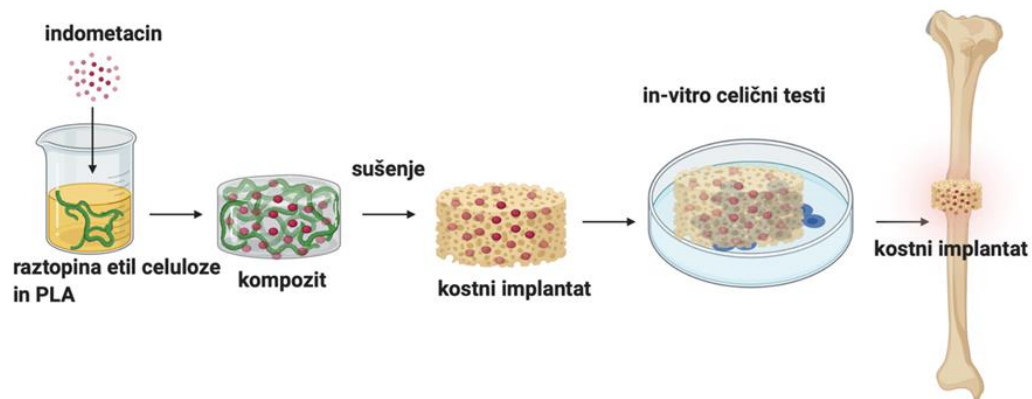
Aerogeli, materiali, ki jih dobimo s superkričnim sušenjem, zaradi svojih edinstvenih lastnosti veljajo za materiale prihodnosti. S pomočjo spreminjanja in prilagajanja procesnih parametrov in vhodnih materialov pa lahko dosegajo vse kriterije, ki jih morajo doseči ortopedski implantati. Tudi kserogeli, materiali, ki so sušeni na zraku, lahko dosegajo vse kriterije, razlika je le v stabilnosti materiala. Vendar je njihova sinteza bistveno preprostejša, saj ne zahtevajo superkričnega CO<sub>2</sub> in jih lahko posušimo le na zraku.

Za uporabo v tkivnem inženirstvu so najbolj uporabljeni in tudi raziskani celulozni aerogeli. Derivat celuloze je tudi etil celuloza, vendar so mehanske lastnosti polisaharidnih aerogelov slabše. V raziskovalni nalogi bomo tako tvorili aerogele in kserogele iz polimlečne kisline in etil celuloze. V te aerogele in kserogele bomo vnesli zdravilno učinkovino in spremljali njeno sproščanje. Spremljali in primerjali bomo tudi razpad pripravljenih materialov.

Cilji:

- pripraviti aerogele in kserogele iz polimlečne kisline in etil celuloze,
- karakterizirati pripravljene materiale,
- v materiale vključiti zdravilno učinkovino in spremljati njeno sproščanje.

Cilje naše raziskovalne naloge smo predstavili tudi grafično, kar prikazuje slika 1. Raziskovalna naloga zajema procese do in-vitro celičnih testov.



Slika 1: Grafični prikaz raziskovalne naloge

Na podlagi ciljev smo si postavili naslednje hipoteze:

1. Nastali materiali bodo imeli makroporozno strukturo, ki je ugodna za rast celic.
2. Razpad materiala v in vitro pogojih je pri kserogelih hitrejši kot pri aerogelih.
3. Indometacin se iz aerogelov in kserogelov sprošča kontrolirano.

## 2 TEORETIČNI DEL

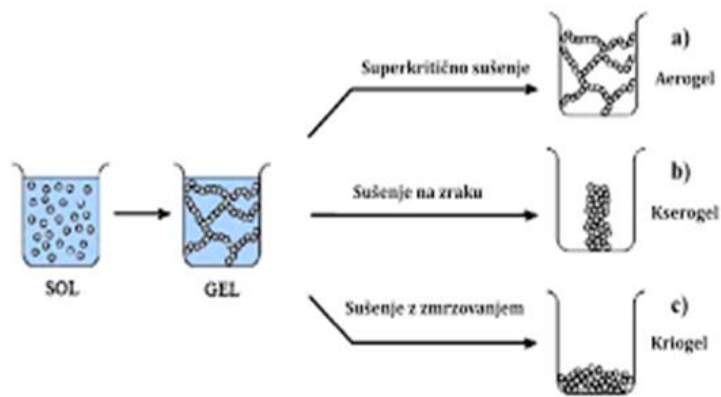
### 2.1 KOSTNI IMPLANTATI

Uporaba različnih vsadkov oz. kostnih implantatov za stabiliziranje kosti in za zdravljenje težkih poškodb je običajna metoda v ortopedski kirurgiji. Do nedavnega so uporabljali večinoma različne kovinske materiale, keramiko ali steklo, ki pa imajo številne pomanjkljivosti, saj jih lahko telo zavrne, da je potrebna sekundarna operacija za odstranitev tega vsadka, in lahko so slabše vzdržljivi. Prednost biorazgradljivih vsadkov je, da lahko zagotavljajo postopni prenos obremenitve na poškodovana območja, zato je manjša verjetnost vnetnih odzivov in zavrnitve vsadka, razgradni produkti pa so vključeni v normalne celične procese; to pomeni, da jih telo samo razgradi in izloči. Taki implantati predstavljajo nižje stroške, hkrati pa omogočajo uspešnejše ter hitrejše okrevanje zaradi nepotrebne sekundarne operacije.

Idealno je, če so ti vsadki biokompatibilni, biorazgradljivi (pomembna je kontrolirana stopnja razpada), nestrupeni, visoko porozni (te pore omogočajo prehod kisika ter razraščanje kosti), imeti morajo dobre mehanske lastnosti in protimikrobno zaščito. [2,3].

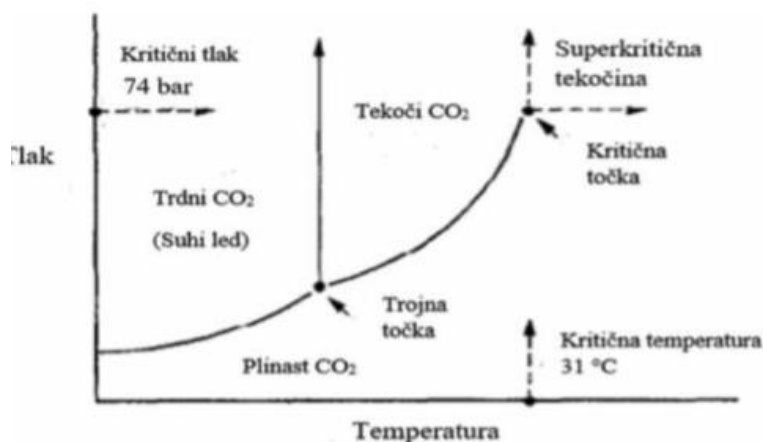
### 2.2 AEROGELI

Med take materiale sodijo aerogeli. To so trdni materiali nizke gostote, ki jih pridobimo iz gela s pomočjo sol-gel procesa. Proces se prične s pripravo soli, v kateri najdemo koloidne delce, ki se nato povežejo v neurejeno in po celotnem volumnu povezano mrežo, ki jo imenujemo gel. S koloidnimi delci se srečujemo v vsakdanjem življenju. To so megla, pene, dim, glina, tudi mleko in majoneza. Delimo jih glede na to, kateri fazi sta pomešani v njih: če sta pomešana trdna in tekoča faza, nastane sol. Naslednji korak je sušenje produktov sol-gel sinteze. S sušenjem na zraku ob sobnih pogojih nastane kserogel, s sušenjem z zamrzovanjem nastane kriogel in s sušenjem s superkritičnim CO<sub>2</sub> nastane aerogel. Pri kserogelih se zaradi izhlapevanja topila material skrči in lahko pride do porušanja njihove strukture. Pri procesu sušenja s superkritičnim CO<sub>2</sub> se topilo/tekoča komponenta (npr: voda ali alkohol) v celoti nadomesti s CO<sub>2</sub>, pri tem se pa njihova struktura ne poruši in dobimo material s skoraj identičnimi dimenzijami. [1,4,5]



Slika 2: Načini priprave končnega materiala iz mokrega gela

Superkritična tekočina nastane, ko ta doseže kritično temperaturo in kritični tlak. Ta temperatura je 31,1 °C in tlak 7,39 MPa. Superkritični CO<sub>2</sub> je eden izmed najbolj uporabljenih superkritičnih fluidov, saj je nevnetljiv, netoksičen in ekonomsko ugoden. Med pomembnejšimi lastnostmi takega CO<sub>2</sub> sta dobra stisljivost in nizka viskoznost, zaradi tega ima tudi dobro sposobnost raztapljanja. V superkritičnem območju tudi ni nobenih napetosti, ki bi vplivale na porušitev krhkih materialov (npr. gelov), zato tudi ne pride do pretiranega skrčenja in se njihova struktura ohrani skoraj v celoti. [8,9]



Slika 3: Fazni diagram ogljikovega dioksida

Aerogeli so bili prvič pripravljene leta 1931 kot rezultat stave med Samuelom Kistlerjem in Charlesom Learnedom, kdo bo uspešno nadomestil tekočino v marmeladnem želeju s plinom, brez skrčenja želeja. Danes so predvsem zaradi svojih edinstvenih lastnosti priljubljeni v številnih panogah. Najdemo jih v gasilskih oblekah, strešnih oknih, raketah, barvah, kozmetiki ... Prednost aerogelov je tudi, da jih lahko pripravimo iz anorganskih in organskih materialov ali pa pripravimo hibride teh dveh komponent.

Imajo izjemno veliko specifično površino ( $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ) in odprto porozno strukturo s poroznostjo do 99 %. Ta podatek je pomemben, saj so zaradi tega odlični nosilci farmacevtskih učinkovin, ki pa jih lahko sproščajo takoj, kontrolirano ali zakasnjeno. Na dotik so podobni trdi peni. Ne glede na težo so mehansko vzdržljivi; prenesejo lahko namreč do 100000 x svoje teže. [6,7]

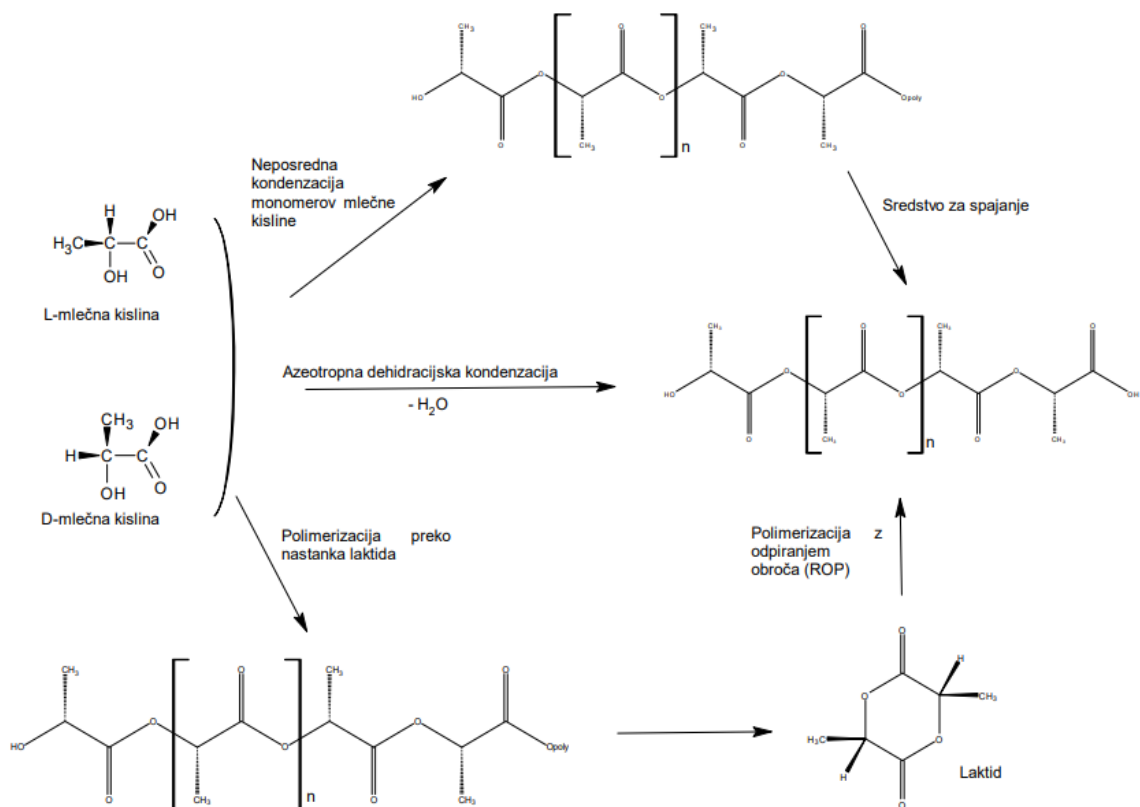
### **2.3 KSEROGELI**

Kserogeli so produkti sol-gel sinteze, ki so bili posušeni na sobnih pogojih. Pri tem pride do spremembe v prostornini, teži, gostoti in strukturi, ki se lahko poruši, pride lahko tudi do velikega skrčenja materiala. V primerjavi z aerogeli imajo kserogeli manjšo površino (površina kserogela je  $150\text{--}900 \text{ m}^2/\text{g}$ , površina aerogela pa  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ) in manjšo poroznost (poroznost kserogela je okoli 89,99 %, poroznost aerogelov pa do 99 %). Velikost por pri kserogelih je od 1 do 10 nm. [10]

### **2.4 POLIMLEČNA KISLINA**

Polilaktična oz. polimlečna kislina (PLA) je derivat mlečne kisline. Je biološko razgradljiv termoplastični poliester z velikim potencialom zaradi svojih edinstvenih fizikalnih lastnosti. Uporablja se v različnih potrošniških izdelkih (npr. skodelicah, kompostnih vrečkah, etiketah ...), kot embalažni material za shranjevanje živil in tudi kot material za 3D-tiskanje.

Proizvodnja PLA ima prednosti pred drugimi sintetičnimi materiali, saj jo lahko pridobimo iz obnovljivih kmetijskih proizvodov, kot na primer koroze, pšenice in sladkornega trsa. PLA se lahko sintetizira na tri različne načine, z neposredno kondenzacijo monomerov polimlečne kisline, s polimerizacijo iz laktida oz. odpiranjem obroča laktida in z azeotropno dehidracijsko kondenzacijo.

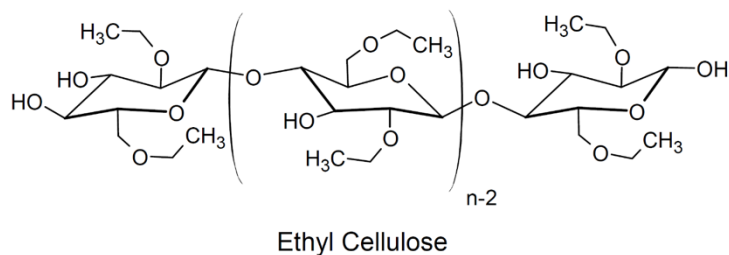


Slika 4: Sinteza PLA

PLA ima dobro biokompatibilnost in razgradljivost, zaradi česar se široko uporablja tudi na medicinskem področju. Tam se uporablja za izdelavo kirurških niti, vsadkov in povojev za rane. Posledično spada med obetavnejše biomedicinske materiale za uporabo pri regeneraciji in popravilu kostnega tkiva. V primerjavi s tradicionalnimi kovinsko-jeklenimi ploščami PLA ne korodira kosti po implantaciji v človeško telo. Ker se lahko absorbira in razgradi v telesu, se hkrati zmanjša možnost vnetja okoliškega tkiva, zaradi česar pogosto pri klasičnih implantatih prihaja do infekcije in zavrnitve implantata. Razgradnja PLA v telesu je pogosto izredno počasna, zato se za boljšo in hitrejšo stopnjo razgradnje lahko dodajo različni polimeri, kot so polisaharidi. Eden izmed njih je etil celuloza. [11,12]

## 2.5 ETIL CELULOZA

Etil celuloza (EC) je polisaharid, derivat celuloze, pri katerem so hidroksilne skupine zamenjane z etilnimi skupinami. Njena gostota je med 1,09 in 1,17 g/cm<sup>3</sup> in je v obliki prahu. Etil celuloza se uporablja za embalažo za živila in kot zaščitni premaz za nadzorovano sproščanje zdravil iz farmacevtskih izdelkov.



*Slika 5: Etil celuloza*

Etil celuloza je netopna v vodi, je pa dobro topna v različnih organskih topilih. Etil celuloza, ki vsebuje med 46 do 48 % etoksi skupin, je topna v tetrahidrofuranu, v metil acetatu, v kloroformu in v mešanicah aromatskih ogljikovodikov etanola; če je teh skupin več, je topna v etanolu, metanolu, toluenu, kloroformu in etil acetatu. Je brez vonja in okusa, ima nizko stopnjo vnetljivosti in je termično stabilna, ker je temperatura tališča med 195 °C in 210 °C. [13,14]

## 2.6 INDOMETACIN

Biorazgradljivi porozni implantati imajo poleg že naštetih še eno lastnost – v njihovo porozno strukturo lahko vnesemo zdravilne učinkovine, ki tako delujejo lokalno na mestu vsadka. S tem lahko znižamo potrebo po kasnejšem intravenoznem zdravljenju in izboljšamo protimikrobni efekt.

Indometacin je nesteroidno zdravilo, ki deluje proti bolečini, zvišani telesni temperaturi in vnetju. Prav tako zmanjšuje obseg oteklina sklepov, pordelost in občutljivost sklepa ter poveča mobilnost in moč oprijema. Odkrit je bil leta 1963, za prvo uporabo pa odobren leta 1965 v ZDA. Od takrat je bil obsežno raziskan v različnih kliničnih preizkušnjah in velja za eno najmočnejših protivnetnih zdravil. Uporablja se pri zdravljenju zmernega do hudega artritisa, osteoartritisa, akutnih bolečin v rami ... Med resnejše stranske učinke spadajo razjede, krvavitve ali luknje v črevesju ali želodcu, ki jih pogosto povzročajo nesteroidna protivnetna zdravila. Prav tako je višje tveganje za možgansko kap ali srčni infarkt. Zaradi naštetih lastnosti smo to zdravilno učinkovino uporabili v naši raziskovalni nalogi kot modelno učinkovino in jo vezali v pripravljene materiale, nato pa preverili sproščanje. [15]



## 3 EKSPERIMENTALNI DEL

### 3.1 KEMIKALIJE

Pri eksperimentalnem delu raziskovalne naloge smo uporabili:

- Etanol – Carlo Erba, abs. anhydrous, for analysis
- Kloroform – Merck, for analysis
- Etil celuloza – Sigma, 48.0–49.5 % w/w epoxy basis
- PLA – GoodFellow, biopolymer, peleti
- NaCl – Fisher Chemicals, analytical reagent grade
- NaHCO<sub>3</sub> – Merck, for analysis
- KCl – Carlo Erba, for analysis
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Kemika, anhydride p. a.
- MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – Honeywell Riedel-de Haën AG, for analysis p. a.
- HCl – Honeywell, ≥ 37 %
- CaCl<sub>2</sub>·2H – Honeywell, ≥ 99 %
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Sigma-Aldrich, ≥ 99.0 %
- (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> – Sigma-Aldrich, ≥ 99 %
- NaOH - Honeywell, ≥ 98%
- Indometacin – Sigma, ≥ 99 %

### 3.2 LABORATORIJSKI INVENTAR IN APARATURE

Pri eksperimentalnem delu raziskovalne naloge smo uporabili:

- petrijevke
- čaše različnih velikosti
- urno steklo
- polnilno pipeto
- žogico za pipetiranje
- bučke različnih velikosti
- tehtič

- spatulo
- žličko
- lonec
- digitalni termometer
- stojalo
- prižemo
- magnetni mešalnik
- magnetno mešalo
- analizno tehniko
- aluminijasto folijo
- napravo za superkrično sušenje
- vrstični mikroskop
- USP II naprava

### 3.3 PRIPRAVA PLA-EC KOMPOZITA

V 100 mL čašo smo natehtali 25 g etanola (EtOH), dodali magnetno mešalo in jo postavili na mešalnik. Vklpili smo mešanje (srednje hitro) in gretje na 100 °C. Čašo smo pokrili z urnim steklom, da smo preprečili izhlapevanje etanola. V tehtič smo natehtali 1 g etil celuloze (EC) in jo dodali v EtOH (Slika 6). Zmes smo mešali in segrevali toliko časa, da se je EC popolnoma raztopila (cca. 10–15 min). Ko smo dobili homogeno raztopino, smo odstavili čašo z vroče plošče in nadaljevali mešanje na hladnem mešalu.



*Slika 6: Raztopina etil celuloze v etanolu med mešanjem*

V 50 mL čašo smo natehtali 25 g kloroforma, čašo smo pokrili z urnim steklom ali parafilmom in jo postavili na mešalnik. V tehtič smo natehtali 1 g polilaktične kisline (PLA) in jo dodali v čašo s kloroformom. Mešali smo, dokler se PLA ni popolnoma raztopila (cca. 1 h). Čaša je bila ves čas pokrita, saj je kloroform izjemno hlapen (Slika 7).



*Slika 7: Raztopina polimlečne kisline na magnetnem mešalu*

Ko smo imeli pripravljene obe raztopini (EC v EtOH in PLA v kloroformu), smo obe čaši odstavili z mešala. Raztopino PLA/kloroform smo prilili v raztopino EC/EtOH med mešanjem, da se je tvoril kompozitni material. Kompozit smo shranili v 100 mL EtOH.

### 3.4 PRIPRAVA PLA-EC Z INDOMETACINOM

Ponovili smo postopek priprave EC/EtOH raztopine. Ko se je pripravljena raztopina ohladila do sobne temperature, smo dodali v raztopino 100 mg indometacina in mešali, dokler se učinkovina popolnoma ni raztopila. Tako pripravljeno raztopino smo nato združili z raztopino PLA/kloroform do nastanka kompozita.

Za pripravo nasičene raztopine indometacina smo na tehtič natehtali 800 mg indometacina, ki smo ga nato kvantitativno prenesli v 100 mL bučko. V bučko smo dodali EtOH do  $\frac{3}{4}$  volumna bučke in dobro premešali, da se je indometacin raztopil (če opazimo, da se indometacin ne raztopi, lahko postavimo bučko na ultrazvočno kopel za 1–2 minuti, kar prikazuje slika 8). Ko se je raztopil, smo dopolnili do oznake volumna in dobro premešali.



*Slika 8: EC/EtOH na ultrazvočni kopeli*

Nato smo končni kompozit hranili v nasičeni raztopini indometacina, ki smo jo predhodno pripravili, kot kaže slika 9.



Slika 9: Kompozita v etanolu in v nasičeni raztopini indometacina

### 3.5 SUŠENJE KOMPOZITOV NA ZRAKU

Slika 9 prikazuje pripravljene kompozite, ki smo jih pustili na sobnih pogojih ter jih sušili do konstantne mase 20 dni.



Slika 10: Sušenje kompozita na zraku po enem dnevu: a) kompozit z indometacinom, b) kompozit brez indometacina

### 3.6 SUPERKRITIČNO SUŠENJE KOMPOZITOV

Supekrično sušenje smo izvedli v Laboratoriju za separacijske procese in produktno tehniko Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru. Superkritično sušenje je

potekalo 5 ur pri 40 °C in 120 barih. Izbrana temperatura in tlak omogočata homogeno fazo CO<sub>2</sub> in etanola znotraj kompozitov. Tako jih lahko sušimo brez faznih interakcij med tekočo fazo etanola in superkrično fazo CO<sub>2</sub>. Sušenje je potekalo pri pretoku 200 Lh<sup>-1</sup>. Po končani ekstrakciji etanola iz kompozitov (Slika 11) smo jih pustili, da se ohladijo do sobne temperature, nato pa shranili v eksikator do nadaljnjih analiz.



*Slika 11: Kompozit posušen superkrično*

### **3.7 KARAKTERIZACIJA**

Karakterizacija materialov je potekala na vrstičnem elektronskem mikroskopu (FE-SEM) Sirion 400 NC. Pripravljene kompozite so bili prevlečeni z zlatimi nanodelci in pritrjeni na aluminijeve nosilce z ogljikovim trakom. Fotografije smo posneli pri napetosti 10 kV z WD-detektorjem.

### **3.8 NABREKANJE**

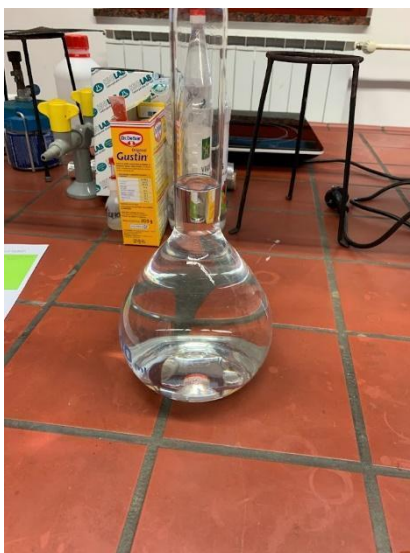
Najprej smo pripravili simulirano prebavno tekočino (SBF – simulated blood fluid). V polietilensko steklenico smo vlili 500 mL destilirane vode in steklenico pokrili z urnim steklom. Destilirano vodo v steklenici smo mešali z magnetnim mešalom in raztapljali reagente enega za drugim, kot je podano v tabeli (naslednji reagent smo dodali šele, ko se je prejšnji reagent v celoti raztopil).

Tabela 1: Seznam in količina kemikalij, ki smo jih uporabili za pripravo SBF.

1	NaCl	7,996 g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,350 g
3	KCl	0,224 g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,174 g
5	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,305 g
6	1M-HCl (približno 90 % skupne količine HCl, ki bo dodana)	40 mL
7	CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub>	0,368 g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071 g
9	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> ali sigma 7	6,057 g

Prilagodili smo temperaturo raztopine na 36,5°C z vodno kopeljo. PH smo prilagodili na 7,40 z mešanjem raztopine in titriranjem 1M-HCl raztopine.

Raztopino smo prenesli iz polietilenske steklenice v stekleno merilno posodo, kot prikazuje slika 11. Tam smo posodo napolnili do 1 litra z destilirano vodo in pri 20°C stresli raztopino. Nato smo jo shranili v hladilniku pri temperaturi 5–10 °C.



Slika 12: Simulirana prebavna tekočina

Tabela 2: Primerjava količine ionov v SBF in v krvni plazmi

Ion	Simulirana prebavna tekočina	Krvna plazma
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0
K <sup>+</sup>	5,0	5,0
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5
Cl <sup>-</sup>	148,8	103,0
HCO <sup>3-</sup>	4,2	27,0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	0,5

Vodno kopel smo pripravili tako, da smo na magnetni mešalnik nastavili lonec, ki smo ga skoraj do vrha napolnili z vodo, kot prikazuje slika 12. Nato smo s pomočjo magnetnega mešalnika regulirali temperaturo na okoli 36,5 °C. Pripravili smo tri stojala in nanje pritrdili prižeme tako, da smo lahko potem tri stekleničke s pufrom in z materialom namestili v lonec, brez da bi se dotikale dna lonca. V 3 enake stekleničke smo do vrha nalili pufer, ki smo ga pripravili predhodno. V vsako stekleničko smo dodali po en pripravljen material in stekleničke zaprli. Nato smo vsako namestili na eno stojalo in jih pritrdili. Zatem smo spremljali njihovo spreminjanje mase.



Slika 13: Vodna kopel



### 3.9 VSEBNOST INDOMETACINA

Vzorci PLA-EC-IND smo dali v 10 mL etanola in mešali pri 500 rpm 96 ur. Po tem času smo vsebnost indometacina določili spektrofotometrično (Varian, Cary 50 Probe UV-spectrophotometer) pri 245 nm. Maso indometacina smo določili preko umeritvene krivulje indometacina v etanolu. Količino indometacina smo določili po enačbi 1:

$$DC [\%] = \frac{m_d}{m_s} \cdot 100, \quad (1)$$

pri čemer sta  $m_d$  masa indometacina (mg), ki smo jo določili spektrofotometrično iz umeritvene krivulje, in  $m_s$  masa kompozita.

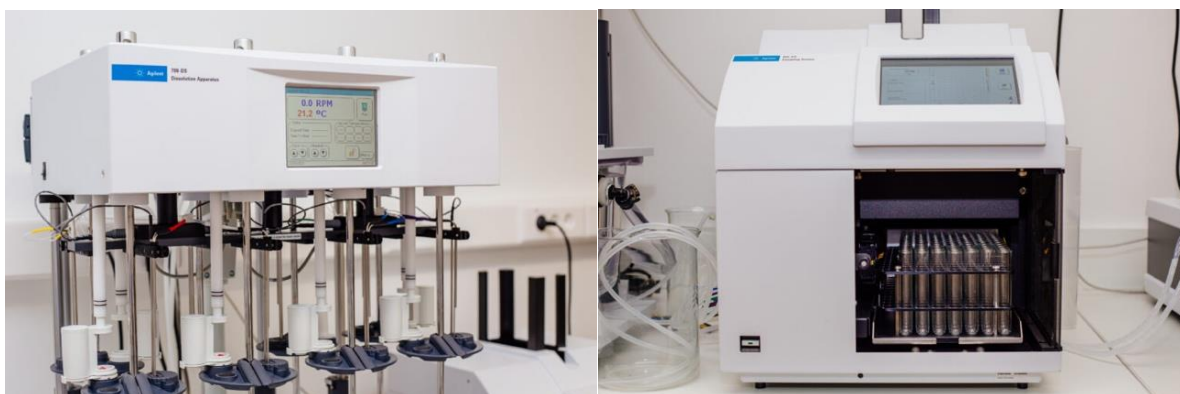
### 3.10 SPROŠČANJE INDOMETACINA

Fosfatni pufer s pH 6.8 smo pripravili tako, da smo zmešali 250 mL 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 112 mL 0,2 M NaOH ter z ultračisto vodo razredčili pripravljen o raztopino do 1000 mL.

Teste sproščanja indometacina smo izvedli v treh ponovitvah pri  $37 \pm 0,5$  °C na USP II napravi (Agilent, 708-DS), kot prikazuje Slika 14. Hitrost mešanja je bila 50 rpm, volumen medija je bil 900 mL. Vzorčili smo 2 mL raztopine po prej določenih časovnih točkah ter analizirali vzorce spektrofotometrično pri 267 nm. Vzorčili smo po 1 h, 2 h, 5 h, 7 h, 12 h, 18 h, 24 h in po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dneh. Po enem tednu smo vzorčili vsakih 7 dni do preteka 5 tednov. Sproščanje smo izračunali po enačbi 2:

$$\text{cumulative release} [\%] = \frac{c \cdot V}{m_t} \cdot 100, \quad (2)$$

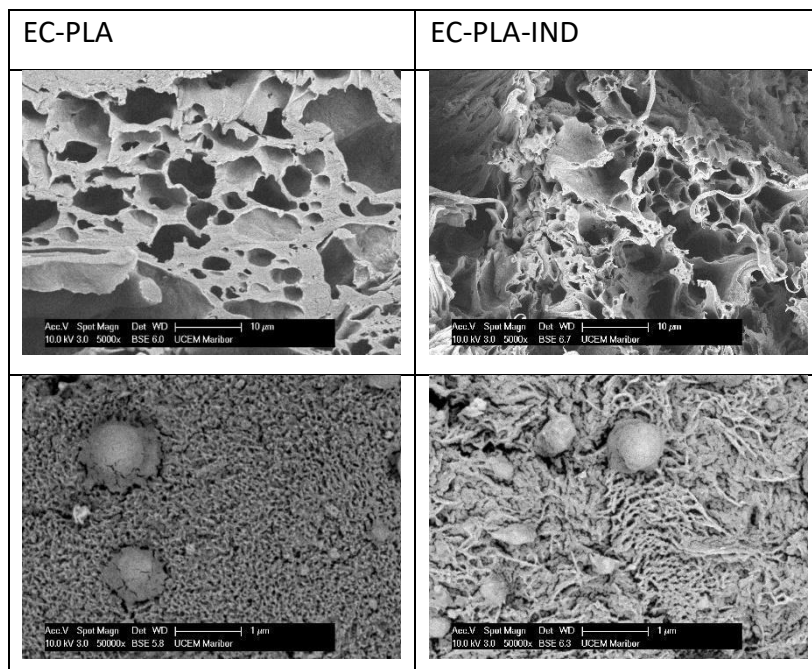
pri čemer sta  $c$  koncentracija indometacina v fosfatnem pufru po določenem času in  $V$  končna koncentracija.



Slika 14: Sproščanje indometacina na USP II napravi

## 4 REZULTATI

### 4.1 KARAKTERIZACIJA



Slika 15: FE-SEM fotografije EC-PLA pri: a) nizki povečavi in b) visoki povečavi

Slika 15 prikazuje fotografije kompozitov iz vrstičnega mikroskopa. Na fotografijah vidimo, da je kompozit EC-PLA visoko porozen z velikimi porami do 10  $\mu\text{m}$ . K makroporoznosti prispeva dodatek PLA k EC. Makroporozna struktura je notranje povezana, kar je ugodno za rast in kolonizacijo celic v primeru uporabe teh materialov za kostne implantate.

### 4.2 NABREKANJE IN RAZPAD PLA-EC

#### 4.2.1 KSEROGELI

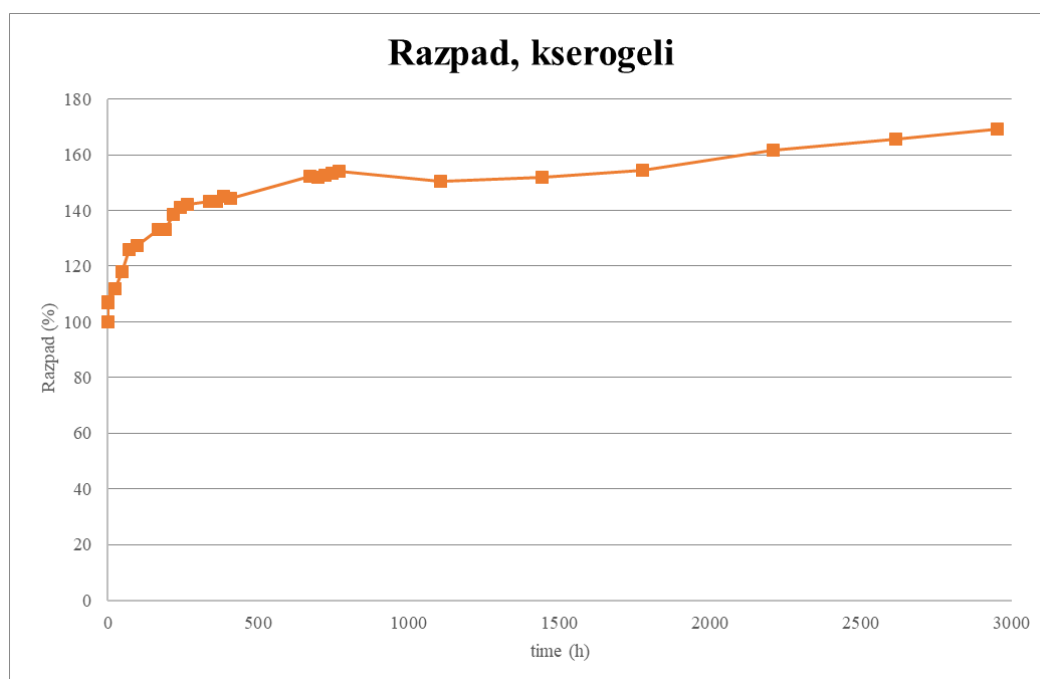
Pri nabrekanju in razpadu smo vzporedno opazovali tri pripravljene kompozite. Meritve smo izvedli po 15 minutah, 1 uri in nato vsak dan do preteka 27 dni, zatem smo meritve izvajali vsakih 14 dni, materiale smo torej spremljali 123 dni. Iz grafa 1 lahko razberemo, da se je masa vseh kserogelov povečala že po 15 minutah. Masa po 2952 urah se je povečala v povprečju za 69,11 %. Masa je na začetku hitreje naraščala, potem pa vedno manj.

Tabela 3: Povprečje razpada pri treh kserogelih

<b>t(h)</b>	0	0,25	1	24	48	72	96	168	192
<b>razpad (%)</b>	100	106,69	107,02	111,75	117,87	125,79	127,42	133,01	133,33

<b>t(h)</b>	216	240	264	336	360	384	408	672	696
<b>razpad (%)</b>	138,59	141,10	142,07	143,26	143,16	145,07	144,48	152,13	152,04

<b>t(h)</b>	720	744	768	1104	1440	1776	2208	2616	2952
<b>razpad (%)</b>	152,66	153,31	153,91	150,30	151,95	154,57	161,81	165,59	169,11



Graf 1: Povprečje razpada pri treh kserogelih v odvisnosti od časa

#### 4.2.2 AEROGELI

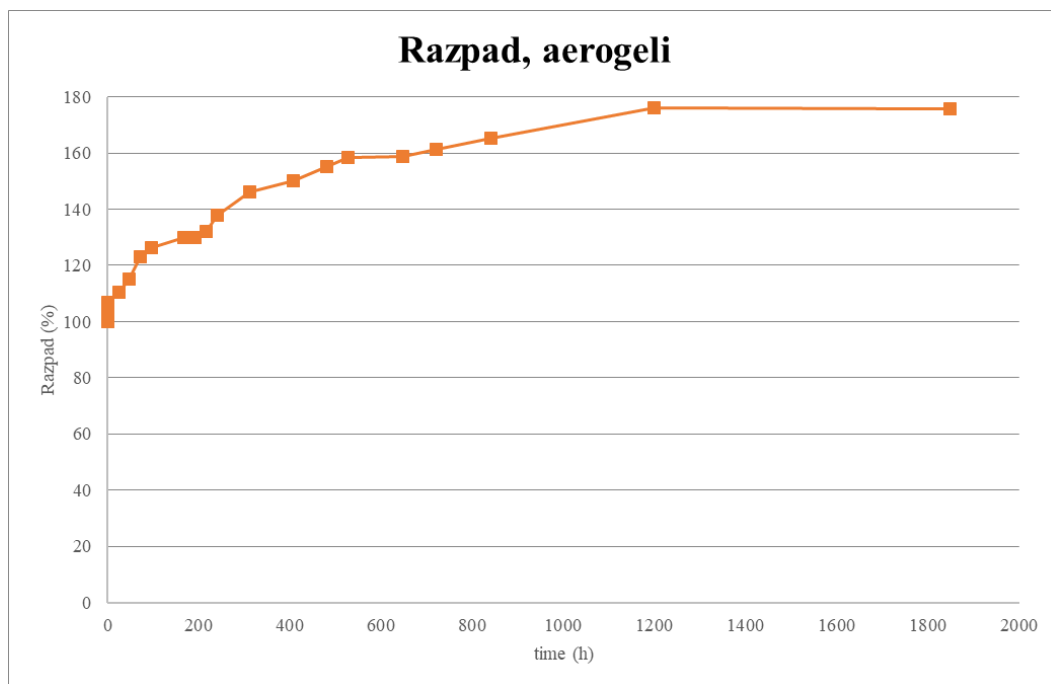
Pri nabrekanju in razpadu smo vzporedno opazovali spreminjanje mase treh kompozitov. Meritve smo izvedli po 15 minutah, 1 uri in nato vsak dan. Po preteku 27 dni smo meritve izvajali na 3 dni, potem na 5, 15 in na koncu še na 27 dni. Materiale smo torej spremljali 77 dni. Iz grafa 2 lahko razberemo, da se je tudi pri aerogelih masa povečala že po 15 minutah. V

povprečju se je masa po 1848 urah povečala za 75,63 %. Masa je tudi tukaj na začetku naglo naraščala, nato pa vedno manj.

Tabela 4: Povprečje razpada pri treh aerogelih

t(h)	0	0,25	1	24	48	72	96	168	192	216
razpad (%)	100	103,07	106,72	110,46	115,00	123,00	126,44	129,99	129,92	132,14

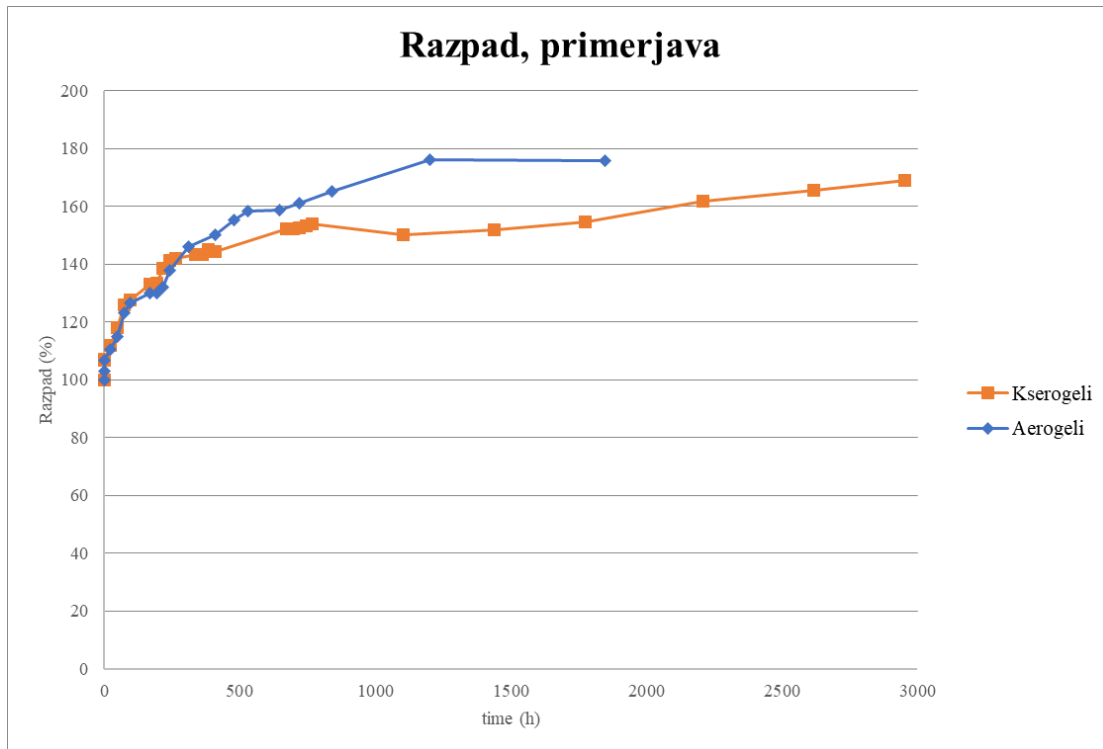
t(h)	240	312	408	480	528	648	720	840	1200	1848
razpad (%)	137,74	146,12	150,07	155,31	158,48	158,8	161,16	165,34	176,00	175,63



Graf 2: Povprečje razpada pri treh aerogelih v odvisnosti od časa

#### 4.2.3 PRIMERJAVA

Iz rezultatov razberemo, da je razpad pri aerogelih in kserogelih potekal zelo podobno in da med rezultati, predvsem na začetku ni večjih razlik. Iz grafa 3 je razvidno, da se je masa pri aerogelih znatneje povečala kot pri kserogelih.



Graf 3: Razpad - primerjava povprečij v odvisnosti od časa

### 4.3 VSEBNOST INDOMETACINA

Iz tabele 5 lahko razberemo, da je masa indometacina, ki smo jo določili po enačbi 1, v vzorcih dokaj podobna. Meritev smo ponovili po 96 urah in dobili rezultate, ki so predstavljeni v tabeli 6. Vsebnost indometacina se je povečala v vseh treh vzorcih. Vsebnost se je najbolj povečala v vzorcu, ki je že na začetku vseboval največ indometacina.

Tabela 5: Vsebnost indometacina

Koncentracija indometacina (mg/mL)	Masa indometacina v vzorcu (mg)	Vsebnost indometacina v vzorcu (%)	Povprečje vsebnosti indometacina v vzorcu (%)
0,151	1,51	0,166	
0,195	1,93	0,210	0,177
0,133	1,33	0,155	

Tabela 6: Vsebnost indometacina po treh dneh

Absorbance (povprečje treh meritev)	Koncentracija indometacina v vzorcu (mg/mL)	Masa indometacina v vzorcu (mg)	Vsebnost indometacina v vzorcu (%)	Povprečje vsebnosti indometacina v vzorcu (%)
1,4941	0,083	16,652	1,830	
1,7234	0,096	19,214	2,067	1,882
1,3445	0,075	14,991	1,749	

### 4.4 SPROŠČANJE INDOMETACINA

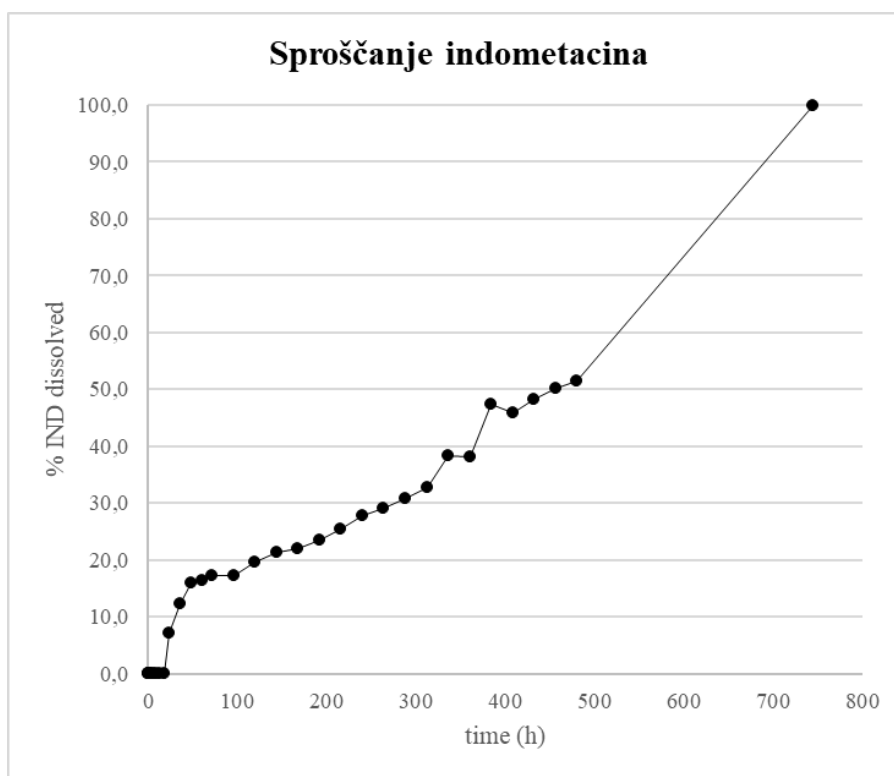
Iz grafa 4, ki prikazuje sproščanje indometacina, razberemo, da se je začela zdravilna učinkovina sproščati po 24 urah. Sproščanje smo spremljali 31 dni, na koncu meritev se je sprostil 5,7 % indometacina. Meritve smo izvajali po 1 h, 2 h, 5 h, 7 h, 12 h, 18 h, 24 h in po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dneh. Po enem tednu smo vzorčili vsakih 7 dni do preteka 5 tednov.

Tabela 7: Sproščanje indometacina

<b>t (h)</b>	0,25	0,5	0,75	1	2	3	5	8	12	18	24
<b>diss. (%)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,41

<b>t (h)</b>	36	48	60	72	96	120	144	168	192	216	240
<b>diss. (%)</b>	0,71	0,92	0,95	0,99	1	1,13	1,23	1,27	1,36	1,47	1,61

<b>t (h)</b>	264	288	312	336	360	384	408	432	456	480	744
<b>diss. (%)</b>	1,68	1,78	1,89	2,22	2,2	2,74	2,65	2,79	2,9	2,97	5,77



Graf 4: Sproščanje indometacina v odvisnosti od časa

## 5 ZAKLJUČEK

V raziskavi smo pripravili kompozitne materiale iz PLA in EC, ki bi lahko služili kot potencialni biorazgradljivi kostni implantati. V te kompozite smo uspešno vezali tudi eno aktivno učinkovino – indometacin, ki se sicer uporablja za zdravljenje artritisa. Dolgoročni cilj raziskave je optimizacija teh materialov, da se bodo v telesu razgradili v času, v katerem bodo celice implantat prerasle. Hkrati bo zdravilna učinkovina ugodno vplivala na rast celic ter pripomogla k hitrejšemu celjenju ter lažšanju bolečin.

**Hipoteza 1: Nastali materiali bodo imeli makroporozno strukturo, ki je ugodna za rast celic.**

Hipoteza je POTRJENA.

Pri pripravljenih kompozitih smo s pomočjo karakterizacije materialov, ki je potekala na vrstičnem elektronskem mikroskopu, posneli fotografije, s katerih smo lahko razbrali, da so nastali kompoziti EC-PLA visoko porozni materiali z velikimi porami do 10  $\mu\text{m}$ . Hkrati imajo tudi manjše pore v velikosti nekaj nm, ki omogočajo, da v materiale vežemo aktivno učinkovino, ki se iz materiala kontrolirano sprošča. Tako smo s kombinacijo PLA, ki prinaša materialu makropore, ter EC, ki prinaša mezopore, dobili ugodni material za nadaljnje analize. Ta makroporozna struktura omogoča ugodno rast in kolonizacijo celic in zaradi tega so pripravljene materiali primerni tudi za kostne implantate.

**Hipoteza 2: Razpad materiala v in vitro pogojih je pri kserogelih hitrejši kot pri aerogelih.**

Hipoteza je OVRŽENA.

Kserogeli se zaradi načina sušenja običajno skrčijo, njihova struktura pa je drugačna od strukture aerogela. V našem primeru nismo opazili bistvenih razlik, zato lahko potrdimo, da je v tem primeru sušenje na zraku enako ugodno kot superkritično sušenje. Spremljali smo nabrekanje in razpad pri treh ponovitvah pri aerogelih in kserogelih. Po opravljenih meritvah in primerjanju le-teh lahko sklepamo, da se nabrekanje in razpad pri aerogelih in kserogelih ne razlikujeta bistveno. Oba materiala sta stabilna v simulirani prebavni tekočini več kot tri mesece.

**Hipoteza 3: Indometacin se iz aerogelov in kserogelov sprošča kontrolirano.**

Hipoteza je POTRJENA.



Sproščanje indometacina smo izvedli v treh ponovitvah na USP II-napravi. Na podlagi meritev, ki smo jih izvedli po 1 h, 2 h, 5 h, 7 h, 12 h, 18 h, 24 h in po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dneh, nato pa po enem tednu vzorčili vsakih 7 dni do preteka 5 tednov, lahko sklepamo, da se je indometacin sproščal kontrolirano. Pripravljeni materiali so primerni za vezavo aktivne učinkovine, kot je indometacin, hkrati pa omogočajo njeno kontrolirano sproščanje.

Cilj raziskovalne naloge je bil pripraviti aerogele in kserogele iz polimlečne kisline in etil celuloze ter nato karakterizirati pripravljene materiale, vanje vključiti zdravilno učinkovino ter spremljati njeno sproščanje. Uspešno smo pripravili aerogele in kserogele, v katere smo potem uspešno vnesli zdravilno učinkovino indometacin. Za tem smo spremljali razpad pripravljenih materialov v in vitro pogojih, spremljali smo tudi vsebnost in sproščanje indometacina iz pripravljenih materialov. Po opravljenih meritvah lahko povemo, da pripravljene materiali izjemno obetavni in da smo zdravilno učinkovino uspešno vezali ter dosegli njeno kontrolirano sproščanje. V prihodnje bi bilo potrebno še več raziskav na in-vitro celičnih linijah in dokončno potrditi, ali so taki materiali primerni za kostne implantate.

## 6 VIRI IN LITERATURA

- [1] Horvat G., Formation, characterization and application of polysaccharide aerogels. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2018.
- [2] Narayan Nanda S., Biodegradable Implants in Orthopaedics, 2015. Dostopno na naslovu: [https://www.researchgate.net/publication/331481571\\_Biodegradable\\_Implants\\_in\\_Orthopaedics](https://www.researchgate.net/publication/331481571_Biodegradable_Implants_in_Orthopaedics) (pridobljeno 26. 2. 2022).
- [3] Felgueiras H., Applications in Wound Healing, 2020. Dostopno na naslovu: <https://encyclopedia.pub/838> (pridobljeno 26. 2. 2022).
- [4] Černič S., Priprava multi membranskih alginatnih aerogelov kot nosilcev aktivnih učinkovin. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2011.
- [5] Quiland H., How Aerogels Work, 2010. Dostopno na naslovu: <https://science.howstuffworks.com/aerogel.htm#pt2> (pridobljeno 26. 2. 2022).
- [6] Gračnar M., Polisaharidni aerogeli za izboljšanje biodostopnosti v slabo topnih substanc. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2015.
- [7] Šutar N., Anomalije v dvodimenzionalnih koloidih. Maribor: Fakulteta za naravoslovje in matematiko, 2010.
- [8] Kramberger K., Kočevar Glavač N., Ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami in njihova uporaba. Dostopno na naslovu: <https://www.sfd.si/wp-content/uploads/sfd/datoteke/kramberger.pdf> (pridobljeno 26. 2. 2022).
- [9] Zdravec K., Termodinamske lastnosti dvofaznega sistema polimer trilaurin/ superkritični CO<sub>2</sub> in formulacija zdravilnih učinkovin. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2019.
- [10] Davis J., McLister A., Passive and Interactive Dressing Materials, 2016. Dostopno na naslovu: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128037621000047> (pridobljeno 26. 2. 2022).
- [11] Grušovnik M., Makroporozni polimeri iz krogličnih šablon. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2016.

[12] Polylactic acid. Dostopno na naslovu: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/polylactic-acid> (26. 2. 2022).

[13] Tkaučič D., Vpliv sinteze na velikost nanodelcev. Maribor: Fakulteta za strojništvo, 2018.

[14] Ethyl Cellulose. Dostopno na naslovu: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/ethyl-cellulose> (pridobljeno 26. 2. 2022).

[15] Indomethacin. Dostopno na naslovu: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00328> (pridobljeno 26. 2. 2022).

## 6.1 VIRI SLIK

Slika 2: <https://core.ac.uk/download/pdf/67582101.pdf> (pridobljeno 26. 2. 2022)

Slika 3: <https://www.sfd.si/wp-content/uploads/sfd/datoteke/kramberger.pdf> (pridobljeno 26. 2. 2022)

Slika 5: <http://polymerdatabase.com/Polymer%20Brands/Ethyl%20Cellulose.html> (pridobljeno 26. 2. 2022)