Zastosowanie elektroprzędzonych nanowłókien jako opatrunków aktywnych w zapobieganiu pourazowym zmianom w tkance mózgowej

kierownik projektu

prof. dr hab. Tomasz A. Kowalewski

Instytut Podstawowych Problemów Techniki Polska Akademia Nauk

Warszawa 2013

Zespół realizatorów projektu

Praca została zrealizowana w dwóch instytutach Polskiej Akademii Nauk: Instytucie Podstawowych Problemów Techniki PAN (IPPT) oraz Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (IMDiK). Zespół z IPPT odpowiadał za opracowanie metody wytwarzania opatrunków neuroprotekcyjnych i ich wytworzenie celem zaimplementowania gotowych mat na modelu zwierzęcym. Zespół IMDiK przeprowadził operacje chirurgiczne i badania histopatologiczne tkanki mózgowej. Praca wspomagana była przez szereg osób zewnętrznych, głównie praktykantów uczelni warszawskich.

IPPT PAN

- 1. Prof. Tomasz A. Kowalewski (kierownik projektu)
- 2. Dr inż. Tomasz Kowalczyk
- 3. Mgr inż. Paweł Nakielski (doktorant)

IMDIK PAN

- 1. dr hab. Małgorzata Frontczak-Baniewicz
- 2. dr Dorota Gołąbek-Sulejczak
- 3. dr Jarosław Andrychowski (również WUM)

Spis treści

Streszczenie	5
1 WSTĘP	10
1. Zjawisko elektroprzędzenia	10
1.2. Zastosowania medyczne elektroprzędzonych nanowłókien	11
1.3. Cel pracy	14
1.4. Procedura przygotowania materiałów elektroprzędzonych	15
2. OTRZYMYWANIE ELEKTROPRZĘDZONYCH SIATEK JAKO OPATRUNK NEUROPROTEKCYJNYCH I SYSTEMÓW UWALNIANIA LEKÓW	ÓW 16
2.1. Otrzymywanie siatek z nanowłókien jako opatrunków neuroprotekcyjnych	16
2.2. Badania nad uwalnianiem leków (alfa-tokoferolu)	17
2.3. Badania procesu uwalniania leków z elektroprzędzonych nanowłókien	19
2.3.1. Badania nad uwalnianiem alfa-tokoferolu z materiałów o różnych jeg	0
zawartościach	19
2.3.2. Badania nad powtarzalnością uwalniania alfa-tokoferolu	20
2.3.3. Badania nad uwalnianiem analogu alfa-tokoferolu do zelu	21
2.3.4. Badania nad uwainianiem lekow z mat zbudowanych z włokien dwufazowych	25
a Wutazowych	23
nanowłóknach Ilwalnianie czynników wzrostu: 8-NGE i BDNE z nanowłókien PLC	27
2 4 1 Materiały i metody	27
2.4.2. Elektroprzedzenie	28
2.4.3. Obrazowanie SEM	29
2.4.4. Uwalnianie czynników wzrostu z nanowłókien	29
2.4.5. Rezultaty	30
3. ZASTOSOWANIE MAT Z ELEKTROPRZĘDZONYCH NANOWŁÓKIEN JAŁ AKTYWNEGO OPATRUNKU DO ZAPOBIEGANIA POURAZOWYM ZMIANO W KORZE MÓZGOWEJ NA MODELU ZWIERZĘCYM - SZCZUR	XO M 36
3.1.Model eksperymentalny:	37
3.2. Cele przeprowadzonych badań:	39
3.3. Uzyskane wyniki:	41
3.4. Wykorzystanie nanomembran jako opatrunku aktywnego na korę mózgową szczura	ро
uszkodzeniu	46
3.5. Wnioski	47
4. PODSUMOWANIE	48

5. SPIS WŁASNYCH PUBLIKACJI POWSTAŁYCH W ZWIĄZKU Z REALIZACJĄ	
GRANTU	
LITERATURA	

Streszczenie

W ramach projektu opracowano metode otrzymywanie nanomembran neuroprotekcyjnych wytwarzanych w procesie elektroprzędzenia. W procesie tym struga roztworu polimeru umieszczona w polu elektrycznym zaczyna wirować tworząc włókna zbierane następnie na wirującym walcu. Materiał (nanomembrany) stosowany w projekcie wytworzony był według następujących procedur: 1) jako materiału użyto poli(L-Laktyd-cokaprolakton, 70 % L-laktyd, 30 % kaprolakton) PLLC (Purasorb 7015, Purac biochem bv, Gorinchem, Holandia). Jest to materiał o obniżonej szybkości biodegradacji (w porównaniu z niemodyfikowanym poli-L-laktydem). Materiał ten posiada dopuszczenia medyczne do systemów uwalniania leków i protez. Materiał był rozpuszczony w układzie chloroform (CHCl3)/dimetyloformamid (DMF). Przykładowy masowy skład roztworu: PLLC - 500 mg, CHCl34700 mg, DMF- 300 mg.; 2) Do tworzenia membran wykorzystano zestaw do elektroprzędzenia składający się z zasilacza z regulowanym napięciem wyjścia DC 0-30kV, pompy strzykawkowej i zestawu hydraulicznego; 3) Roztwór materiału po rozpuszczeniu przechowywany był przynajmniej 12 godzin dla odseparowania i spęcznienia łańcuchów polimeru. Używano napięcia 15 kV, a odległość targetu 20 cm. Wydatek pompy wynosił 0,5 ml/h. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22-24°C).

Przeprowadzono badania z wykorzystaniem nanomembran impregnowanych neuroprotekcyjnymi substancjami ochronnymi takimi jak alfa-tokoferol (ograniczający stres oksydacyjny). Podjęto próby zastosowania białkowych czynników neurotroficznych: NGF i BDNF.

Badania prowadzone były na szczurzym modelu chirurgicznego uszkodzenia mózgu. Umożliwiły one prześledzenie i analizę mechanizmów naprawy i przebudowy kory mózgowej w wybranym czasie po uszkodzeniu mózgu. Chirurgiczny uraz okolicy czołowo-skroniowej kory mózgowej szczura wykonywany był w stanie uśpienia ogólnego zwierzęcia i polegał na usunięciu kości i opony twardej i wycinka kory mózgowej o wielkości ok. 1mm x1mm x 1mm. Po zszyciu skóry i wybudzeniu zwierzę umieszczane było w standardowych warunkach zwierzętarni. W punktach czasowych określonych harmonogramem Projektu zwierzęta były usypiane a pobrane od nich tkanki przygotowywano do dalszych badań.

Badaniami objęto następujące grupy zwierząt:

- nanomembrana jako opatrunek

1. zwierzęta kontrolne nieoperowane, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

2. zwierzęta z operacją pozorowaną (tzw. sham), na których wykonane zostały opisane powyżej procedury eksperymentalne jedynie do etapu trepanacji czaszki, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3. zwierzęta z zastosowanymi biodegradowalnymi powłokami z nanowłókien na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

4. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym kory mózgowej (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

5. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym z raną pooperacyjną pokrytą elektroprzędzonymi biodegradowalnymi powłokami (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

- nanomembrana jako opatrunek aktywny - uwalniający tokoferol

1. zwierzęta kontrolne nieoperowane, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

2. zwierzęta z operacją pozorowaną (tzw. sham), na których wykonane zostały opisane powyżej procedury eksperymentalne jedynie do etapu trepanacji czaszki, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3. zwierzęta z zastosowanymi biodegradowalnymi powłokami z nanowłókien zawierającymi tokoferol w dawce 5% na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

4. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym kory mózgowej (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

5. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym z raną pooperacyjną pokrytą elektroprzędzonymi biodegradowalnymi powłokami zawierającymi tokoferol w dawce 5% (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

<u>- nanomembrana jako opatrunek aktywny - uwalniający czynnik troficzny czynnik</u> wzrostu nerwów - NGF

1. zwierzęta kontrolne nieoperowane, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

2. zwierzęta z operacją pozorowaną (tzw. sham), na których wykonane zostały opisane powyżej procedury eksperymentalne jedynie do etapu trepanacji czaszki, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3. zwierzęta z zastosowanymi biodegradowalnymi powłokami z nanowłókien zawierającymi NGF w dawce 0,02 % (10 ng/cm2 maty) na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

4. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym kory mózgowej (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

5. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym z raną pooperacyjną pokrytą elektroprzędzonymi biodegradowalnymi powłokami zawierającymi NGF w dawce 0,02 % (10 ng/cm2 maty) (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

<u>- nanomembrana jako opatrunek aktywny - uwalniający czynnik troficzny</u> pochodzenia mózgowego - BDNF

1. zwierzęta kontrolne nieoperowane, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

2. zwierzęta z operacją pozorowaną (tzw. sham), na których wykonane zostały opisane powyżej procedury eksperymentalne jedynie do etapu trepanacji czaszki, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3. zwierzęta z zastosowanymi biodegradowalnymi powłokami z nanowłókien zawierającymi BDNF w dawce 0,02 % (10 ng/cm2 maty)...na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

6

Streszczenie

4. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym kory mózgowej (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

5. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym z raną pooperacyjną pokrytą elektroprzędzonymi biodegradowalnymi powłokami zawierającymi BDNF w dawce 0,02 % (10 ng/cm2 maty) (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

Pierwszym etapem prowadzonych badań była optymalizacja (przy pomocy metod mikroskopowych optycznych i elektronowych) metod wytwarzania elektroprzędzonych nanowłókien do zastosowania jako opatrunki i opatrunki aktywne impregnowane neuroprotekcyjnymi substancjami ochronnymi (alfa-tokoferol, białkowe czynniki neurotroficzne: NGF i BDNF). Kolejnym etapem prac było określenie cech elementów złącza nerwowo-naczyniowego mózgu szczura po urazie chirurgicznym oraz zastosowaniu biodegradowalnych nanomembran we wszystkich grupach eksperymentalnych.

Wykorzystanie technik immunohistochemicznych miało na celu ocenę uszkodzenia i wywołanej nim odpowiedzi komórkowej (komórek nerwowych, glejowych i śródbłonkowych) po urazie chirurgicznym kory mózgowej oraz po zastosowaniu biodegradowalnych powłok z elektroprzędzonych nanomembran, w wyznaczonych harmonogramem badań czasach po operacji we wszystkich grupach eksperymentalnych. Ze względu na wprowadzenie do organizmu zwierząt ciała obcego (nanomembran) konieczna była ocena odpowiedzi zapalnej.

W materiale pozyskanym ze zwierząt kontrolnych nieoperowanych obserwowano prawidłową budowę morfologiczną wszystkich elementów złącza nerwowo-naczyniowego. Nie wykryto zmian degeneracyjnych dotyczących komórek parenchymy mózgowej.

Podobne wyniki pozyskano z materiału pochodzącego od zwierząt poddanych operacji pozorowanej (Sham).

Materiał uzyskany od zwierząt z powłokami zastosowanymi na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej wykazała, że opatrunek nie wywołuje większych zmian w badanych strukturach. Nie obserwowano śmierci komórek kory ani objawów reakcji zapalnej ze strony OUN (brak makrofagów oraz aktywacji mikro– i astrogleju). W okolicy aplikacji opatrunku wykryto jedynie niewielki wzrost liczby GFAP pozytywnych astrocytów, które jednak nie wykazywały cech hipertrofii. Otrzymane wyniki wskazują, że materiał cechuje biokompatybilność z tkanką.

W grupie zwierząt poddanych operacji neurochirurgicznej obserwowano masywną neurodegenerację i śmierć komórek nerwowych oraz astrogleju, najbardziej nasiloną w okresie od 4 do 14 dni po operacji. W badanej tkance zaobserwowano obecność komórek pozytywnie znakujących się dla nestyny. Wiele z nich charakteryzowało się morfologią typową dla astrocytów, ale tylko nieliczne wykazywały jednoczesną obecność immunosygnału dla GFAP. W tym samym czasie w badanym materiale znaleziono małą liczbę komórek pozytywnie wyznakowanych dla nestyny i NeuN (marker komórek nerwowych). Już we wczesnych punktach czasowych rejestrowano masywny napływ makrofagów (już w 4 dni po uszkodzeniu - średnio 46 makrofagów w obszarze 20 analizowanych mikroskopowych pól widzenia). Procesom tym towarzyszyło formowanie nowych naczyń kapilarnych w okolicy okołourazowej. W sąsiedztwie nowopowstających naczyń krwionośnych znajdowano znaczną ilość komórek pozytywnie znakujących się dla AC133/Flk1 (markerów niedojrzałych komórek śródbłonkowych) oraz metaloproteinaz: MMP2 i MMP9. Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały, iż komórki te posiadały w cytoplazmie nietypowe włókienka o grubości charakterystycznej dla filamentów pośrednich.

Komórki te brały udział w formowaniu nowych naczyń. Badania immunohistochemiczne wykazały silną ekspresję białek przestrzeni zewnątrzkomórkowej: lamininy, kolagenu i fibronektyny w okolicy okołonaczyniowej. We wczesnych czasach pooperacyjnych dochodziło do masywnej astroglejozy oraz aktywacji komórek astrocytarnych. Astrocyty nabierały cech hipertrofii i tworzyły na powierzchni rany rozległą bliznę glejową o "nieuporządkowanej" strukturze. Formowanie blizny glejowej obserwowano od 14 dnia po lezji. Część z komórek tworzących bliznę wykazywała pozytywne znakowanie dla wimentyny – markera młodocianych form astrocytów. W 30 dni po urazie w badanej tkance pojawiały się cechy destabilizacji blizny oraz degeneracji wtórnej. Prowadziły one do atrofii tkanki w obszarze pierwotnie uformowanej blizny glejowej (60 dni po operacji).

Analiza materiału pozyskanego ze zwierząt z urazem zaopatrzonym opatrunkiem z nanowłókien wykazała brak zmian zapalnych we wszystkich badanych punktach czasowych (rejestrowano jedynie kilka makrofagów w 20 analizowanych polach widzenia), w przeciwieństwie do obserwacji poczynionych w grupie zwierząt z urazem. Nie obserwowano formowania nowych naczyń ani masywnej blizny glejowej. Wykryto niewielką indukcją astogleju (GFAP i Wimentyno-pozytywny) oraz tworzenie się subtelnej, ledwie zarysowanej blizny na powierzchni uszkodzonej kory mózgowej. Część z tworzących ją komórek wykazywała pozytywne znakowanie dla wimentyny. Wyniki te wykazują, że nanosiatka posiada właściwości modulujące proces bliznowacenia. Dodatkowo maty z nanowłókien hamowały krwawienie po wykonanym zabiegu. Otrzymane wyniki wskazują, że materiał zastosowany w badaniach w terapii pourazowej układu nerwowego cechuje nie tylko biokompatybilność z tkanką ale również działanie hemostatyczne. Jak wspomniano, po zaopatrzeniu rany opatrunkiem z nanowłókien nie dochodzi do procesu angiogenezy przyrannej. Mechanizm tego zjawiska wymaga dalszych badań.

Kolejnym etapem prowadzonych eksperymentów było zbadanie efektów zastosowania mat z nanowłókien jako opatrunków aktywnych – uwalniających w miejscu uszkodzenia czynniki neurotroficzne i potencjalnie neuroprotekcyjne. Uzyskane dotychczas wyniki wskazują, że zastosowanie mat z nanowłókien zawierających tokoferol, NGF i BDNF na nieuszkodzoną korę mózgową nie wywołuje reakcji zapalnej ani śmierci komórek. Szczegółowa analiza materiału pozyskanego od zwierząt operowanych z raną zaopatrzoną membranami zawierającymi tokoferol, NGF lub BDNF nie wykazała wpływu uwalnianych czynników na stan tkanki nerwowej. Elementy złącza nerwowo-naczyniowego posiadały cechy występujące w grupie zwierząt poddanych operacji i zaopatrzonych membraną niezawierającą czynnika protekcyjnego (opatrunek nieaktywny).

Uzyskane wyniki sugerują protekcyjne działanie samej membrany z nanowłókien. przypuszczamy, że protekcyjny charakter membran może wynikać z faktu, iż produktem ich biodegradacji są mleczany, których pozytywny wpływ na tkankę nerwową był opisywany w literaturze. Ponadto struktura przestrzenna zastosowanych nanomembran może imitować prawidłową strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej promując prawidłowe gojenie ran i ograniczając obszar powstającej blizny.

Zastosowanie materiałów w postaci nanomembran w obrębie strefy urazu ośrodkowego układu nerwowego może być wykorzystane jako forma terapii, ponieważ wpływa korzystnie na miejscowe procesy pourazowe, modyfikuje miejscowe reakcje komórkowe, stwarza barierę izolacyjną uniemożliwiając napływ fibroblastów oraz zmniejsza bliznowacenie. Ponadto, czas degradacji nanomateriału może zostać zaplanowany w procesie wytwarzania, a produkty są metabolitami charakterystycznymi dla tkanek organizmu (mleczany) co wpływa na brak toksyczności miejscowej oraz ma działanie protekcyjne dla układu nerwowego.

Streszczenie

Wyniki pracy zaprezentowano w formie publikacji, patentu i wystąpień konferencyjnych. Dotyczyły one analizy i optymalizacji otrzymywania włókien oraz ich zastosowania jako systemów uwalniania leków oraz w jako opatrunku neuroprotekcyjnego. Znaczna część niniejszego raportu weszła w skład prac głównych wykonawców projektu ze strony IPPT PAN: pracy habilitacyjnej dr inż. Tomasza Kowalczyka [I] oraz pracy doktorskiej mgr inż. Pawła Nakielskiego[II].

1 Wstęp

1. Zjawisko elektroprzędzenia



Rys. 1-1 Schemat eksperymentalnego zestawu do elektroprzędzenia i zdjęcie z mikroskopu elektronowego uzyskanej siatki z nanowłókien [I, II].

Elektroprzędzenie jest procesem fizycznym w którym oddziaływanie sił elektrostatycznych na kroplę i strugę roztworu polimeru prowadzi do indukowania jednoimiennych ładunków. Odpychanie między nimi prowadzi do znacznego wydłużenia strugi płynu i jej pocienienia. Powstające po odparowaniu rozpuszczalnika włókna polimerowe mają średnicę podlegającą rozrzutowi statystycznemu, zależną od użytych materiałów i warunków prowadzenia procesu: od kilku nanometrów do kilku mikrometrów. Długość włókien może osiągać do kilkudziesięciu cm, włókna są zbierane na uziemionym kolektorze.

W eksperymentalnym procesie elektroprzędzenia struga roztworu lub stopu polimeru wypływa z cienkiej dyszy podłączonej do zasilacza wysokiego napięcia. Wypływający z dyszy roztwór znajduje się w silnym polu elektrycznym (0,1 – 1 kv/cm). Po przebyciu krótkiego odcinka prostego roztwór zaczyna poruszać się po spirali w drodze do uziemionego kolektora włókien. Znajdujące się w roztworze jednoimienne ładunki rozciągają strugę, podczas, gdy siły kapilarne nie dopuszczają do jej rozerwania. Z silnie rozciąganej strugi odparowuje rozpuszczalnik. Na kolektorze otrzymuje się włókna polimerowe o długości do kilkudziesięciu cm i średnicy podlegającej rozrzutowi statystycznemu.

Kluczowym elementem procesu elektroprzędzenia jest niestabilność kapilarna. Istotą procesu niestabilności kapilarnej zajmował się zespół Renekera i Yarina [1] na przykładzie biodegradowalnego polimeru – poli(kaprolaktonu) – PCL.



Rys. 1-2 Zdjęcia strugi elektroprzędzonego polimeru wykonane z użyciem szybkiej kamery z prędkością rejestracji 60 (a) i 4500 (b) klatek na sekundę [2,3].

Autorzy stwierdzili, że wtórna niestabilność kapilarna może zachodzić również podczas rozciągania strugi w pętlę, co powoduje powstanie materiału o poskręcanej strukturze i sklejonych połączeniach pomiędzy włóknami.

Proces rlektroprzędzenia zależny do bardzo wielu parametrów, kluczowe dla procesu są przyłożone napięcie, odległość pomiędzy dyszą a kolektorem, wydatek masowy roztworu polimeru, średnica dyszy, rodzaj polimeru, jego masa cząsteczkowa, stężenie polimeru w roztworze, przewodnictwo elektryczne roztworu polimerowego oraz jego napięcie powierzchniowe. Jest wiele innych parametrów które mają mniejsze znaczenie dla elektroprzędzenia. W związku z tym z jednej strony proces musi być każdorazowo optymalizowany dla nowego składu roztworu do elektroprzędzenia. Eksperymentalne elektroprzędzenie prowadzi do produktów o cechach jakościowych zbliżonych do produktów naturalnych, przy czym zawsze występuje kilkuprocentowy rozrzut właściwości uzyskiwanych materiałów. Optymalizację warunków elektroprzędzenia prowadzi się w celu znalezienia parametrów dla których proces będzie dawał włókna pozbawione defektów typu "koraliki na sznurku", o właściwościach przypominających bardziej nanocząstki niż nanowłókna.

Jednym z podejść do procesu jest skorzystanie z modelu numerycznego elektroprzędzenie dla uniknięcia wielokrotnego powtarzania eksperymentów metodą prób i błędów. Model taki dawałby ilościową odpowiedź na zmianę parametrów procesu. Nie ma jednego dobrego modelu. Matematyczny model symulujący dynamikę elektroprzędzenia i postać uzyskanych nanowłókien został opisany np. w pracy [4].

1.2. Zastosowania medyczne elektroprzędzonych nanowłókien.

Nanowłókna mają bardzo duży potencjał do zastosowań w medycynie. Jest to w poważnej mierze spowodowane możliwością utworzenia z włókien membran podobnych do naturalnej zewnątrzkomórkowej macierzy kolagenu. Macierz ta jest zbudowana z włókien o średnicy 50-500 nm. Nanowłókna mogą naśladować tą macierz, zarówno pod względem zbliżonej grubości włókien jak i właściwości mechanicznych. Sztuczna macierz z nanowłókien ma za zadanie tymczasowo służyć komórkom jako rusztowanie. Docelowo powinna zostać rozłożona przez komórki organizmu i zastąpiona naturalnym kolagenem wytworzonym przez

obecne w organizmie fibroblasty, tak, aby nie powodować reakcji organizmu na ciało obce. Niezbędne do tego są biodegradowalne polimery, najczęściej pochodne polilaktydu, degradującego do kwasu mlekowego i poli(glikolidu) tworzącego podczas degradacji kwas glikolowy. Obydwa te polimery i ich kopolimery są szeroko stosowane do wyrobu wchłanialnych nici chirurgicznych.

W pracy [5] zajmowano się optymalizacją parametrów elektroprzędzenia, badaniem parametrów mechanicznych oraz degradacją in vitro i in vivo membran otrzymanych z elektroprzędzonego polikaprolaktonu. Stwierdzono szybszą degradację membran wszczepionych pod skórę szczurów w porównaniu do degradacji w in vitro. Praca [6] pokazuje syntezę biodegradowalnych polimerów pochodnych kwasu mlekowego i opisuje badanie ich biodegradacji. Autorzy pracy przeglądowej [7] opisują sposoby tworzenia funkcjonalizowanych rusztowań z biodegradowalnych nanowłókien do zastosowań biomedycznych.

W pracy [8] zaproponowano zasady projektowania rusztowań z elektroprzędzonych nanowłókien, ze zwróceniem szczególnej uwagi na uzyskanie parametrów mechanicznych ukierunkowanych włókien podobnych do parametrów odtwarzanej tkanki. Autorzy podjęli próbę optymalizacji elektroprzędzenia poli(estro-uretanu) w celu otrzymania matrycy do rekonstrukcji zastawki serca. W pracy [9] optymalizowano elektroprzędzenie fibrylarnych białek: kolagenu, żelatyny, alfa-elastyny i tropo-elastyny; w celu otrzymania rusztowań do hodowli komórek. Rusztowania takie powinny naśladować strukturę zewnątrzkomórkowej macierzy kolagenu zarówno pod względem fizycznym, jak i chemicznym. Białka elektroprzędzono z użyciem denaturującego rozpuszczalnika i sieciowano diizocjanianem. Testy mechaniczne pokazały podobieństwo do materiałów naturalnych, a hodowle mezenchymalnych komórek embrionalnych wykazywały dobrą adhezyjność i proliferację wskazując potencjał do zastosowania w regeneracji tkanek. W pracy [10] przeprowadzono optymalizację elektroprzędzenia poli(alkoholu winylowego). W zależności od zastosowanych warunków uzyskane włókna wykazywały średnicę 0,2-8,0 mikrometrów. Na utworzonych porowatych membranach hodowano komórki mięśniowe i fibroblasty, wskazując na potencjał użycia materiałów w inżynierii tkankowej.

pracy [11] hodowano fibroblasty i porównywano markery białkowe W dla kompozytowego rusztowania w którym połączono polisacharyd dekstran z nanowłóknami poli(laktydu-co-glikolidu). Dekstran zapewniał wysoką porowatość oraz hydrofilowość i w konsekwencji dobrą adhezyjność komórek do nanowłókien. Komórki chętnie migrowały do wnętrza trójwymiarowego rusztowania tworząc materiał o potencjale zastosowania do leczenia trudno gojących się ran. Autorzy pracy [12] porównując zachowanie elektroprzędzonych rusztowań z chityny z komercyjnym opatrunkiem stwierdzili szybszą biodegradację materiału z nanowłókien zarówno w testach in vitro, jak i po wszczepieniu pod skórę szczura. Materiał nie wywoływał odczynu zapalnego, a testowane komórki skóry traktowały go preferencyjnie w porównaniu do mikrowłóknistego komercyjnego opatrunku, szczególnie po pokryciu nanowłókien naturalnym kolagenem I. Materiał nie działał cytotoksycznie na komórki, autorzy proponowali jego perspektywiczne zastosowanie do leczenia ran skóry i błon śluzowych. Inny sposób leczenia ran proponowali autorzy pracy [13]. Tworzyli rusztowania z mieszaniny polikaprolaktonu i kolagenu. Ludzkie komórki skóry wykazywały dobrą do nich adhezyjność, dobrze rosły na nich. Autorzy pracy [14] użyli rusztowań wykonanych z kolagenu elektroprzędzonego w denaturującym rozpuszczalniku, usieciowanego następnie glutaraldehydem. Otrzymane włókna pokrywane były następnie

niedenaturowanym kolagenem, aby zwiększyć adhezyjność do nich komórek skóry. Badania wykonane na szczurach pokazały potencjał w leczeniu ran.

Elektroprzędzenie jako stosunkowo nowa metoda jest jeszcze słabo wykorzystana w tworzeniu nowych systemów uwalniania leków. Szereg prac grupy związanej z Uniwersytetem Technion zajmuje się zarówno teoretyczną analizą tematu, otrzymywaniem systemów uwalniania leków wykorzystujących nanowłókna jak i wykorzystaniem ich w eksperymentach na szczurach [15,16,17]. W pracy [18] wykorzystano elektroprzędzenie emulsji do utworzenia systemów uwalniania leków utworzonych z mikrokapsułek zawierających lek zawieszonych na matrycy z nanowłókien. Zbadano profile uwalniania leku z materiału w zależności od stopnia usieciowania powierzchni mikrokapsułek. Wskazano możliwości dalszego użycia jako struktur funkcjonalnych biologicznie. W pracach [19] badano wpływ dodatku surfaktantów na proces elektroprzędzenia polilaktydu oraz na uwalnianie leków. Badano uwalnianie leków: Rifampiny i Paclitaxelu z uzyskanych materiałów. Stwierdzono początkowe uwolnienie dużej ilości (wyrzut) leku (Rifampiny) spowodowany powstaniem jego kryształów na powierzchni nanowłókien podczas elektroprzędzenia. Uniknięcie tego efektu można było osiągnąć przez zastosowanie roztworów polimerów o charakterze podobnym do uwalnianych leków, tak aby uniknąć separacji faz podczas elektroprzędzenia.

Stan badań elektroprzędzenia nanowłókien pokazuje duży potencjał tej metody zarówno do zastosowania w inżynierii tkankowej, medycynie regeneracyjnej, opatrunkach jak i w systemach uwalniania leków.

1.3. Cel pracy

Podstawowym celem pracy jest zastosowanie elektroprzędzonych nanowłókien jako opatrunków aktywnych w zapobieganiu pourazowym zmianom w tkance mózgowej.

Powypadkowe i pooperacyjne urazy centralnego układu nerwowego prowadzą do bardzo poważnych konsekwencji społecznych i ekonomicznych. Wymagają one długotrwałego leczenia farmakologicznego, powodują postępującą degradację stanu zdrowia pacjentów, podwyższają koszty świadczeń społecznych i obciążenie systemu opieki zdrowotnej na obszarze Polski i Unii Europejskiej. Powstające w ich konsekwencji bliznowacenie, adhezja, zrosty zaburzają funkcjonalność układu nerwowego, są przyczyną niepożądanych objawów neurologicznych negatywnie wpływających na przebieg procesu zdrowienia. Dane kliniczne dotyczące procedur zapobiegających bliznowaceniu w obrębie mózgowia są dość skąpe. Nie są obecnie stosowane rutynowo żadne materiały zabezpieczające przed blizną w obrębie mózgowia, a dodatkowe materiały uszczelniające czy hemostatyczne np. Tachocomb czy Oxycel powstałe na bazie kolagenu zwierzęcego mogą wywołać miejscową reakcję na obce białko i odczyn wokół ciała obcego.

Brak skutecznej profilaktyki stał się powodem do rozpoczęcia badań nad nowym rodzajem materiałów do zastosowań klinicznych po urazach centralnego układu nerwowego. Wśród nowych metod terapeutycznych stosowanych w medycynie nanotechnologia wydaje się obecnie dziedziną bardzo obiecującą. Prowadzi się m.in. badania nad wykorzystaniem materiałów uzyskanych w tej technologii w charakterze barier po uszkodzeniu narządów i tkanek. Korzystne oddziaływanie z tkanką, uzyskanych w drodze elektroprzędzenia mat z nanowłókien, skłoniły nas do poszukiwania potencjalnych zastosowań tego materiału w neurochirurgii. Choć prowadzone są już obecnie na świecie badania nad biomedycznym zastosowaniem procesu elektroprzędzenia, to brak jest jakichkolwiek doniesień o próbach powstrzymania degradacji kory mózgowej przez zastosowanie aktywnych opatrunków bazujących na biokompatybilnych nanowłóknach.

W ramach projektu przeprowadzono prace nad wytworzeniem prototypu opatrunku o charakterze neuroprotekcyjnym. Oparty na nanowłóknach system uwalniania leków ma za zadanie ochronę mózgu przed uszkodzeniem następującym w krótkim czasie po urazie (śmierć elementów złącza nerwowo-naczyniowego kory mózgowej) i w długim czasie po urazie (operacji) gdy dochodzi od destabilizacji i rozkładu blizny glejowej oraz wtórnej neurodegeneracji i śmierci komórek nerwowych. Opatrunek taki miałby zapobiegać powstawaniu ciężkich zmian w obrębie centralnego układu nerwowego. Analiza wytworzonych w ramach projektu opatrunków przeprowadzona na podstawie prób na zwierzętach laboratoryjnych pozwoliła na stwierdzenie ich neuroprotekcyjnych własności i otwiera drogę do dalszych badań klinicznych i ewentualnej komercjalizacji.

1 Wstęp

1.4. Procedura przygotowania materiałów elektroprzędzonych

Otrzymanie materiałów wytworzonych metodą elektroprzędzenia związane było z zaprojektowaniem i zbudowaniem odpowiedniej komory o kontrolowanych warunkach środowiskowych, opracowaniem metodologii wytwarzania mat nanowłókniny z wybranych materiałów, opracowaniem metody związania z materiałem maty wybranych czynników neuroprotekcyjnych, oraz wybranie struktury włókien i maty pozwalającej na kontrolowane uwalnianie tych czynników. Zastosowanie wytwarzanych mat w operacjach mózgu na modelu zwierzęcym wymagało również opracowania metody zapewnienia ich aseptyczności.

W dalszej części pracy opisano:

- o tworzenie nowych materiałów uwalniających leki,
- o modelowanie uwalniania leków do roztworu o warunkach fizjologicznych,
- o modelowanie uwalniania leków do symulowanej tkanki mózgowej,
- Zastosowanie mat z elektroprzędzonych nanowłókien jako aktywnego opatrunku do zapobiegania pourazowym zmianom w korze mózgowej na modelu zwierzęcym - szczur

2. Otrzymywanie elektroprzędzonych siatek jako opatrunków neuroprotekcyjnych i systemów uwalniania leków

Poniżej przedstawiono otrzymywanie metoda elektroprzędzenia siatek Ζ biodegradowalnego polimeru do zastosowania jako opatrunków neuroprotekcyjnych na modelu zwierzęcym - szczur. Badania obejmowały również uzyskanie elektroprzędzonych systemów uwalniania leków lub ich analogów. Przebadano uwalnianie leku - tokoferolu do płynu w warunkach fizjologicznych oraz jego analogu – rodaminy B do żelu o cechach Optymalizowano otrzymywanie elektroprzędzonych tkanki mózgowej. materiałów zawierający analog leków białkowych - albuminę surowicy wołowej. Otrzymywano materiały zawierające czynniki neuroprotekcyjne - czynnik wzrostu neuronów (NGF) i neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (BNDF). Zbadano ich uwalnianie w warunkach fizjologicznych. Wyniki opublikowano [I, II,]

2.1. Otrzymywanie siatek z nanowłókien jako opatrunków neuroprotekcyjnych

Przeprowadzone badania nad wykorzystaniem procesu elektroprzędzenia do wytwarzania opatrunków neuroprotekcyjnych wykonano dla szeregu materiałów biodegradowalnych biorąc pod uwagę:

- dobór materiałów i parametrów procesu celem uzyskania regularnych siatek pozwalających na stworzenie stabilnych opatrunków,
- dobór materiału do elektroprzędzenia pod katem wiązania go z neuroprotekcyjnym czynnikiem aktywnym,
- dobór materiału polimerowego, geometrii włókien i ich struktury dla uzyskania optymalnych przebiegu czasowego dla uwalnianego czynnika.

Jako pierwsze wykonano badania nad doborem odpowiedniego polimeru do procesu elektroprzędzenia. Przetestowano rodzinę biodegradowalnych poliestrów zawierających w strukturze jednostki kwasu mlekowego. Użyto następujące, posiadające certyfikaty materiały przeznaczone na systemy uwalniana leków produkowane i dostarczane przez firmę PURAC (Gorinchem, Holandia):

- Poli(DL-laktyd-co-glikolid) PDLG
- Poli(laktyd-co-glikolid) PLG
- Poli(L- laktyd)– PLLA
- Poli(L-laktyd-*co*-kaprolakton) PLCL

Stwierdzono, że dla badanych biodegradowalnych poliestrów pochodnych kwasu mlekowego nie ma znaczących różnic w podatności na elektroprzędzenie, jedynie poli(laktydco-glikolid) – PLG tworzył materiał o strukturze waty, nie nadający się do dalszych badań.

Kierując się danymi literaturowymi dotyczącymi procesu biodegradacji poli(hydroksyestrów) należało wybrać materiał, który nie degraduje się zbyt szybko (istniała możliwość podrażnienia tkanki mózgowej przez produkt degradacji o kwas mlekowy), ani nie będzie się degradował zbyt wolno (dla poli(kaprolaktonu) czas degradacji szacowany jest na 2 lata. Przyjęto założenie, że materiał o czasie degradacji zbliżonym, ale nie tak długim jak PCL będzie miał optymalne właściwości. Materiałem tym jest PLCL (poli(L-laktyd-co-kaprolakton) zawierający 70% jednostek PLLA i 30% jednostek PCL.

Przeprowadzono szereg testów, które miały na celu kontrolę powtarzalności procesu. Uzyskane dane pozwoliły stwierdzić, że:

- roztwór do elektroprzędzenia nie może być przygotowany tuż przed eksperymentem, gotowy roztwór musi być pozostawiony co najmniej do następnego dnia. Elektroprzędzenie świeżo sporządzonego roztworu powoduje powstanie licznych defektów typu "koraliki na sznurku" oraz elektrosprej roztworu polimeru. Efekt ten tłumaczy się tym, że łańcuchy polimeru muszą mieć czas na spęcznienie w rozpuszczalniku, na "rozplecenie się" (Rys. 2-1).

uzyskanej membrany nie można od razu zdejmować z targetu (obrotowego walca).
 Materiał zdjęty od razu zwija się, zmieniają się jego wymiary. Efekt ten można wytłumaczyć tym, że świeżo uzyskany materiał posiada naprężenia, które stopniowo zanikają w czasie kilku godzin. Może to mieć związek zarówno z krystalizacją materiału, jak i z odparowaniem pozostałości rozpuszczalnika.

Uzyskano maty odpowiednie do przeprowadzenia badań nad utworzeniem opatrunku neuroprotekcyjnego.





Rys. 2-1. Obraz SEM mat elektroprzędzonych z roztworu przygotowanego: 4 dni przed wcześiej, materiał udany (po lewej) i materiału elektroprzędzonego od razu, materiał nieudany (po prawej) [I, II].

2.2. Badania nad uwalnianiem leków (alfa-tokoferolu)

Alfa-tokoferol jako antyoksydant został wybrany jako modelowa substancja neuroprotekcyjna. Wytworzono maty zawierające 10 do 32% wag. alfa-tokoferolu. Uwalnianie prowadzono do roztworu micelarnego (0,5% dodecylosulfonianu sodowego SDS) symulującego środowisko komórkowe.

1. W łaźni wodnej utrzymującej temperaturę 37,0°C +/- 0,2°C, symulujące warunki panujące w ludzkim organizmie (dla modelu szczura jest to 37,7-38,5°C), bez mieszania

2. W temperaturze pokojowej (22-24°C) z mieszaniem

Uwalnianie planowanym miejscu użycia opatrunku, tj. na powierzchni mózgu przebiega w zakresie pomiędzy 1. a 2.



Rys. 2-2. Wykres uwalniania alfa-tokoferolu z włókien "litych" o zawartości 15% wag., □- uwalnianie z mieszaniem, ◊ uwalnianie bez mieszania (na lewo). Po prawej stronie obraz SEM maty z której prowadzono uwalnianie. Widoczny brak defektów i właściwa struktura maty [I, II].

Uzyskane wyniki pokazują czas uwalniania leku rzędu 12-14 dni, tj. odpowiedni do założeń projektowanego opatrunku neuroprotekcyjnego.

Przeprowadzono również obserwację uwalniania substancji lekopodobnej (Rodaminy B) z cienkiej wiązki elektroprzędzonych nanowłókien. Proces monitorowany był *in situ* z użyciem lasera 532 nm Uzyskane wyniki wykorzystano do walidacji modelu numerycznego procesu uwalniania leków. Mogą one posłużyć do jakościowej charakteryzacji procesu uwalniania leków z membrany wykonanej z elektroprzędzonych nanowłókien.

Badania nad uwalnianiem leków z mat zbudowanych z włókien dwufazowych

Włókna otrzymywano z elektroprzędzenia emulsji zawierającej albuminę surowicy wołowej (BSA), której zadaniem było symulowanie uwalniania leków białkowych. Docelowo albumina ma być użyta jako główny składnik białkowy - czynnik osłaniający leki białkowe (NGF- czynnik wzrostu neuronów, BNDF- neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego) przed denaturacją.

Przeprowadzono serię eksperymentów, białka oznaczano metodą Bradforda. We wszystkich badanych układach uzyskano wyrzut (burst) uwalnianego białka.

Nie uzyskano profilu uwalniania odpowiedniego do projektowanego opatrunku neuroprotekcyjnego. Temat wymaga dalszych badań z użyciem włókien w układzie typu "rdzeń-osnowa" ("core – shell").

2.3. Badania procesu uwalniania leków z elektroprzędzonych nanowłókien

Badania nad tworzeniem systemów uwalniania leków obejmowały tworzenie elektroprzędzonych membran zawierających tokoferol i jego analogi oraz analogów leków białkowych - albuminy surowicy wołowej (BSA). Badania nad membranami z tokoferolem obejmowały: określenie profili uwalniania dla różnych zawartości alfa-tokoferolu w materiale włókien, badanie nad powtarzalnością procesu otrzymywania włókien i określenie, czy sterylizacja membran tlenkiem etylenu ma wpływ na profil uwalniania leku. Wykonano również walidację doświadczalną modelu uwalniania leku do tkanki mózgowej. Badania nad lekami białkowymi obejmowały wykonanie dwóch typów elektroprzędzonych materiałów zawierających białka (włókna uzyskane z emulsji i w układzie typu "rdzeń-osnowa"). Zbadano profile uwalniania białek dla obydwu typów materiałów dla zmiennych parametrów materiałowych. Badania te miały na celu konstrukcję opatrunku do zbadania wpływu elektroprzędzonych membran na tkankę mózgową w zwierzęcym modelu uszkodzenia mózgu obejmowały porównanie procesu bliznowacenia bez zastosowania nanomateriału i z jego zastosowaniem dla różnych punktów czasowych. Analizowano obrazy znakowane immunofluorescencyjnie oraz ultrastrukturę komórki dla membran z nanomateriału zbudowanych z polimeru oraz z polimeru zawierającego alfa-tokoferol.

2.3.1. Badania nad uwalnianiem alfa-tokoferolu z materiałów o różnych jego zawartościach

Pierwszym wykonanym materiałem z terapeutykiem był materiał o zawartości 15% wag. alfa-tokoferolu (względem polimeru). Uwalnianie prowadzono do roztworu micelarnego (0,5% dodoecylosulfonianu sodowego) symulującego środowisko komórkowe w temp 37°C. Materiał w czasie trzech tygodni uwolnił 60% pierwotnej zawartości substancji aktywnej i po tym czasie we włóknach pozostało tylko około 6% wag. alfa-tokoferolu. Materiał po sterylizacji tlenkiem etylenu został przekazany do IMDiK PAN celem wstępnych badań na modelu zwierzęcym operacyjnego urazu mózgu na modelu zwierzęcym.

W wynikach z eksperymentów pilotażowych zauważono nieznaczny obrzęk tkanki mózgowej i zdecydowano się na zmniejszenie początkowej ilości alfa-tokoferolu w materiale. Uzyskano kolejne nanomateriały o zawartości 10% wag. i 5% wag. alfa-tokoferolu. Po około trzech tygodniach uwalniania można zauważyć, że w przypadku materiału o 10% wag. leku, uwolniło się 55% początkowej ilości alfa-tokoferolu zaś w przypadku materiału o 5% wag. – 45%. Taką sytuację w której dla coraz niższych początkowych zawartości leku, po czasie trzech tygodni uwalniania obserwujemy coraz mniejsze ilości uwolnionego leku można wytłumaczyć spadkiem siły napędowej procesu uwalniania (zmniejszenie gradientu stężeń alfa-tokoferolu w materiale i otaczającym płynie).



Rys. 2-3. Profile uwalniania alfa-tokoferolu dla różnych początkowych zawartości leku w materiale [I, II].

2.3.2. Badania nad powtarzalnością uwalniania alfa-tokoferolu

Przeprowadzono szereg testów, które miały na celu zbadać powtarzalność procesu uwalniania leku z elektroprzędzonych nanowłókien. Badania nad kontrolą powtarzalności uwalniania wynikły z faktu iż elektroprzędzenie jest procesem bardzo zmiennym, nieznaczna zmiana warunków otoczenia, może mieć znaczny wpływ na strukturę materiału, a tym samym uwalnianie leku.

Wszystkie materiały przygotowano w ten sam sposób, a następnie elektroprzędzono w takich samych warunkach:

Napięcie	15	kV
Odległość dyszy od kolektora	20	cm
Natężenie obj. pompy	0,40	ml/h
Temperatura	24	°C
Wilgotność względna	55	%

Uwalnianie prowadzono w temperaturze T=37°C, do roztworu micelarnego (0,5% wodny roztwór dodecylosulfonianu sodowego SDS) symulującego środowisko komórkowe. Uzyskane dane pozwoliły stwierdzić, że dla takich samych warunków procesowych, a także materiałowych, możliwe jest uzyskanie zbliżonych profili uwalniania alfa-tokoferolu. Badania przeprowadzono również pod kątem jednorodności samego materiału. W tym celu pobrano trzy kawałki: z części środkowej oraz z dwóch przeciwległych brzegów materiału. Dodatkowo sprawdzono wpływ sterylizacji materiału tlenkiem etylenu na proces uwalniania. W obu przypadkach: badania jednorodności materiału oraz sterylizacji nie wykazano znaczących różnic w profilu uwalniania alfa tokoferolu.



Rys. 2-4. Porównanie profilu uwalniania atokoferolu dla trzech takich samych materiałów wytworzonych w innym czasie. Punkty przedstawiają średnią[I, II].



Rys. 2-6. Porównanie profilu uwalniania atokoferolu z materiału po sterylizacji z tym samym materiałem przed sterylizacją. Punkty przedstawiają średnią [I, II].



Rys. 2-5. Porównanie profilu uwalniania atokoferolu dla trzech różnych kawałków tego samego materiału. Punkty przedstawiają średnią[I, II].



Rys. 2-7. Porównanie profilu uwalniania atokoferolu. Punkty przedstawiają średnią ze wszystkich materiałów [I, II].

2.3.3. Badania nad uwalnianiem analogu alfa-tokoferolu do żelu

Na potrzeby walidacji modelu numerycznego oraz oszacowania stężenia leków w tkance mózgowej, skonstruowano układ eksperymentalny w którym uwalniano analogi leków z materiałów polimerowych uzyskanych w procesie elektroprzędzenia. Informacja o lokalnym stężeniu leku jest pomocna w oszacowaniu efektu terapeutycznego i ewentualnego przekroczenia toksycznej wartości stężenia. Przedstawiony poniżej układ eksperymentalny, dzięki zastosowaniu płaskiej wiązki lasera wzbudzającej dyfundującą substancję fluorescencyjną pozwala na przedstawienie pola stężenia w wybranym położeniu w kuwecie pomiarowej wypełnionej hydrożelem. Zastosowanie płaskiej wiązki lasera pozwala na bezpośrednią obserwację lokalnego stężenia analogu leku w danym punkcie kuwety, bez konieczności wykonywania transformacji stężenia w przypadku oświetlania układu światłem wzbudzającym fluorofor w całej objętości układu. W przypadku rejestracji światła emitowanego przez fluorofor, z całej objętości układu lub rejestracji absorbancji barwnika, rejestrowana jest informacja o średnim stężeniu barwnika na grubości kuwety pomiarowej. Z uwagi na transport barwnika w trzech wymiarach i uśrednianie stężenia w jednym z wymiarów, do uzyskania stężenia w określonym punkcie przestrzeni, wymagana jest transformacja stężenia w otaczających punktach. Podejście takie komplikuje znalezienie wartości stężenia i jest źródłem błędów.

Poniższy opis prezentuje układ pomiarowy do czasoprzestrzennej ewaluacji stężenia uwalnianych leków, celem znalezienia parametrów odpowiedzialnych za dynamikę uwalniania leków. Płynem w którym analizowano proces uwalniania i dyfuzji leku był żel z poli(alkoholu winylowego) PVA usieciowany boraksem. Ze względu na swoją przezroczystość i brak efektów rozpraszania światła na łańcuchach polimeru obecnych w żelu, płyn ten może posłużyć jako model tkanki mózgowej. Jako analog leku stosowanego w badaniach na modelu zwierzęcym – α -tokoferolu, użyto Rodaminy B. Różnica mas molowych obu substancji wynosi około 10%, zatem współczynnik dyfuzji obu składników jest zbliżony. Jako analog leków białkowych: β -NGF oraz BDNF, użyto białka albuminy surowicy wołowej sprzężonej z izotiocyjanianem fluoresceiny (BSA-FITC). Uwalnianie prowadzono z materiałów o takiej samej geometrii: średnica krążka r = 2,5 mm, grubość d = 100 µm. Proces monitorowany był *in situ* z użyciem lasera 532 nm (Rodamina B) lub 472 nm (BSA-FITC). Długość fali wzbudzenia dla Rodaminy B wynosi 540 nm, zaś dla BSA-FITC 490 nm. Maksimum emisji w przypadku Rodaminy B obserwowano dla długości fali 625 nm zaś dla BSA-FITC 525 nm.

Wiązka lasera o długości fali 532 nm lub 472 nm przechodzi przez przysłonę podłaczoną do komputera (Rys. 2-8a). Światło lasera przekształcane jest w płaską wiązkę dzięki układowi dwóch soczewek: płasko-wklęsłej oraz dwuwypukłej. Światło przechodzące przez kuwete pomiarowa wypełniona hydrożelem, wzbudza składnik fluorescencyjny dyfundujący z materiału umieszczonego na wierzchu hydrożelu. Emitowane światło przechodzi przez filtr emisyjny (Rodamina B – 602 ± 15 nm, BSA-FITC – 540 ± 12 nm) i jest rejestrowane przez kamerę cyfrową (Manta G-201B, Allied Vision Technologies) w postaci obrazów formatu TIFF. Ustawienia kamery były następujące: czas ekspozycji 400 ms, wzmocnienie sygnału pięciokrotne. Aby uniknąć wypalania składnika fluorescencyjnego oraz zachować stabilność intensywności świecenia lasera, źródło światła pozostawało przez cały eksperyment włączone i było odcięte przysłoną podłączoną do komputera PC. Niewielką ilość światła ok. 5% skierowano na fotodiodę w celu zmierzenia intensywności świecenia lasera. Dane z fotodiody rejestrowano w trakcie eksperymentu w celu dokonania ewentualnych korekt w przebiegu stężenia rejestrowanego w czasie. Otwarcie przysłony sprzężono z układem rejestrującym obraz i kontrolowano przy użyciu skryptu napisanego w programie MATLAB®. Układ eksperymentalny izolowano od zewnętrznych źródeł światła mogących wprowadzać zakłócenia.

Obrazy rejestrowane podczas eksperymentu przycinano do obszaru zainteresowania a informacje o intensywności świecenia w danej odległości od materiału, zbierano do dalszej obróbki. Podczas przeprowadzanych doświadczeń, materiał umieszczony na hydrożelu nie przemieszczał się. Największe zaobserwowane przemieszczenie w jednym z eksperymentów wynosiło 1 mm. W celu określenia stężenia obu składników fluorescencyjnych, sporządzono krzywe wzorcowe (Rys.2-9). Otrzymane wartości intensywności pikseli dla przypadku użycia Rodaminy B jako analogu leku, są bliskie wartości 255 dla 8 bitowej kamery. W naszych eksperymentach podjęto starania uniknięcia wartości intensywności świecenia bliskich wartościom maksymalnym, w tym celu zmniejszano intensywność świecenia lasera.



Rys. 2-8. a) Układ eksperymentalny do oceny elektroprzędzonych materiałów [II]. b) Kontury stężenia Rodaminy B otrzymane podczas eksperymentu [II]. Punkt P₁ to punkt w którym zbierano informacje na temat wartości stężenia dla poszczególnych czasów eksperymentu. Wartości stężenia posłużyły do znalezienia parametrów kinetycznych modelu numerycznego c) Kontury stężenia uzyskane po dopasowaniu współczynników w modelu numerycznym [II].



Rys. 2-9. Krzywa kalibracyjna dla Rodaminy B oraz BSA-FITC w hydrożelu PVA [II].



Rys. 2-10. Stężenie Rodaminy B (szare trójkąty) w punkcie P₁ oraz zmierzona wartość napięcia na fotodiodzie (gruba czarna linia). Szara pozioma linia to średnia wartość napięcia na fotodiodzie. Linia czerwona przedstawia skorygowaną wartość stężenia Rodaminy B po uwzględnieniu zmian natężenia lasera [II].

Uzyskane wyniki, w szczególności wartość stężenia w punkcie P_1 w funkcji czasu, wykorzystano do walidacji modelu numerycznego procesu uwalniania leków. Przykładowy przebieg profilu stężenia rejestrowanego w czasie eksperymentu przedstawiono na Rys. 2-10. Zbierane co 5 minut dane stężenia w punkcie P_1 przedstawiono w postaci punktów (szare trójkąty). W przebiegu profilu stężenia zauważalne są etapy w których stężenie zmniejsza się gwałtowniej pod wpływem spadku natężenia światła lasera. Aby skorygować przebieg profilu stężenia na fotodiodzie i zarejestrowane dane stężenia

przemnożono przez współczynnik korekcyjny. Skorygowane wartości stężenia w punkcie P₁ przedstawiono czerwoną linią na Rys. 2-10.

Dzięki wykorzystaniu omówionego układu eksperymentalnego otrzymano informacje na temat stężenia analogu leku, mogące posłużyć do walidacji modelu numerycznego uwzględniającego desorpcję leku z powierzchni nanowłókien. Przedstawiona metoda wykorzystująca hydrożel jako fantom tkanki mózgowej, pozwala na oszacowanie efektu terapeutycznego i ewentualnego przekroczenia stężenia toksycznego. Wygodna i szybka metoda przygotowania hydrożelu i brak efektu rozpraszania światła na łańcuchach polimeru pozwalają na zastosowanie hydrożelu w analizach uwalniania leków z materiałów opartych na nanowłóknach.

2.3.4. Badania nad uwalnianiem leków z mat zbudowanych z włókien dwufazowych

Elektroprzędzone nanowłókna otrzymywano z elektroprzędzenia emulsji oraz w układzie "rdzeń-osnowa" ("core-shell") zawierającej albuminę surowicy wołowej (BSA), której zadaniem było symulowanie uwalniania leków białkowych. Docelowo albumina ma być użyta jako główny składnik białkowy - czynnik osłaniający leki białkowe (NGF - czynnik wzrostu neuronów, BNDF- neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego) przed denaturacją. W przypadku elektroprzędzenia emulsji przy zachowaniu odpowiednich warunków możliwe jest uzyskanie struktury rdzeń-osnowa, przy czym rdzeń nie ma struktury ciągłej zaś przybiera formę blisko przylegających kropli fazy wodnej (Rys.2-11). Taka struktura ma za zadanie wyhamować proces uwalniania leku, a tym samym przedłużyć czas uwalniania.



Rysunek 2-11. a) Nanowłókna powstałe z elektroprzędzenia emulsji. Zdjęcie wykonano mikroskopem fluorescencyjnym, barwnik - fluoresceina b) Nanowłókna powstałe w układzie "rdzeń-osnowa". Zdjęcie wykonano mikroskopem konfokalnym, barwnik – Rodamina B [I, II].

Przeprowadzono serię eksperymentów, białka oznaczano metodą OPA (metoda fluorymetryczna z wykorzystaniem aldehydu orto-ftalowego). Wytwarzanie włókien z roztworów emulsyjnych oraz układów rdzeń-osnowa jest znacznie bardziej skomplikowane

niż włókien z alfa-tokoferolem. Duży wpływ na wynik, ma osoba przygotowująca materiał oraz samo przestrzeganie procedury przygotowywania materiału.



Rys. 2-12. Profile uwalniania BSA z nanowłókien w układzie "rdzeń-osnowa" dla różnych stężeń białka w rdzeniu oraz polimeru w osnowie [I, II].

W przypadku materiałów typu rdzeń-osnowa widoczny jest początkowy wyrzut leku (Rys. 2-12). Spowodowane jest to najprawdopodobniej pękaniem (przerywaniem) nanowłókien, z których wypływa roztwór leku. Zauważalne jest to podczas obserwacji nanowłókien, naniesionych na szkiełka nakrywkowe, pod mikroskopem fluorescencyjnym. Po krótkim czasie od naprzędzenia na szkiełko nakrywkowe, widoczne są świecące obszary wokół włókien. Ponownie zauważalny jest wpływ zwiększonego stężenia początkowego białka na proces uwalniania. Jednakże, w tym przypadku mimo czterokrotnego zwiększenia stężenia początkowego BSA (20% wag. względem roztworu rdzenia), maksymalna wartość uwolnionego białka nie jest znacząco większa niż w przypadku 5% wag. (względem roztworu rdzenia). Najprawdopodobniej jest to spowodowane przez opory transportu białka z włókna. Po początkowym, dużym wyrzucie białka obserwujemy zwiększanie ze stałą szybkością ilości uwolnionego BSA.



Rys. 2-13. Profile uwalniania BSA z nanowłókien elektroprzędzonych z emulsji dla różnych stężeń białka oraz z użyciem surfaktantu [I, II].

W przypadku uwalniania białka z włókien sporządzonych metodą emulsyjną, obserwujemy zupełnie odmienny charakter procesu. Brak jest zauważalnego wyrzutu leku, zaś sam przebieg punktów przypomina obserwowany wcześniej profil uwalniania alfatokoferolu. Porównano również wpływ użycia innego typu surfaktantu na proces uwalniania białka (Rys. 2-13). Punkty o kolorze zielonym przedstawiają wyniki dla materiału z użyciem surfaktantu SPAN-80, zaś punkty o kolorze fioletowym – SDS (dodecylosulfonianu sodowego). W przypadku BSA, brak jest zauważalnych różnic w profilu uwalniania.

2.4. Wytwarzanie systemów uwalniania leków opartych na elektroprzędzonych nanowłóknach. Uwalnianie czynników wzrostu: β-NGF i BDNF z nanowłókien PLC

2.4.1. Materiały i metody

Do sporządzenia nanowłókien wykorzystano polimer poli(L-laktyd- ϵ -kaprolakton) (PLC, zawierający 70% jednostek L-laktydu i 30% kaprolaktonu) zakupiony w firmie Purac, Biochem BV, Gorinchem, Holandia. Chloroform (CHCl₃), dimetyloformamid (DMF) oraz glicerynę zakupiono w firmie POCH, Polska. Albuminę surowicy wołowej (Bovine Serum Albumin -BSA), BSA sprzęgnięte z izotiocjanianem fluoresceiny(BSA-FITC), poli(tlenek etylenu) (PEO, $M_w = 400\ 000\ Da$), SPAN-80 zakupiono w firmie Sigma Aldrich. Rekombinowany czynnik wzrostu β -Nerve Growth Factor (β -NGF) oraz neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (Brain Derived Neurotrophic Factor - BDNF) zakupiono w firmie R&D Systems (nr kat. 556-NG-100, 248-BD-025). Wszystkie materiały użyto bez dalszego oczyszczania.

2.4.2. Elektroprzędzenie

Materiały z nanowłókien sporządzono z 9 % wag. roztworu PLC rozpuszczonego w mieszaninie DMF i CHCl₃ 1:9 (wag./wag.). Odpowiednia ilość polimeru odważano, następnie dodano chloroform i mieszano do całkowitego rozpuszczenia polimeru. Do tak przygotowanego roztworu dodano odpowiednią ilość drugiego rozpuszczalnika - DMF. Roztwór pozostawiano na 24 godziny dając czas łańcuchom polimeru na rozwiniecie. Materiały zawierające hydrofilowe białka (β-NGF, BDNF) sporządzono z roztworu emulsji. Do przygotowania roztworu emulsji typu woda w oleju odmierzono 1 g roztworu polimeru i wymieszano z 40 mg surfaktantu SPAN-80 (masa dodanego surfaktantu była jednym ze zmiennych parametrów). Po 30 min mieszania, dodano 50 mg roztworu 1 % wag. BSA z czynnikiem β -NGF lub BDNF w 0,01M buforze PBS (Phosphate Buffered Saline o pH = 7,4) ((masa fazy wodnej była jednym ze zmiennych parametrów). Fazę wodną dodawano kroplami i po każdym zakropleniu mieszano aż do uzyskania jednorodnej emulsji. Druga metoda otrzymywania nanowłókien z hydrofilowym czynnikiem wzrostu było współosiowe elektroprzędzenie dwóch roztworów polimerów – jednego z lekiem w rdzeniu i drugiego z polimerem pełniącym funkcję membrany osłaniającej rdzeń (ang. core-shell). W metodzie tej wykorzystano własnoręcznie wykonana dyszę do elektroprzędzenia typu rdzeń - osnowa (Rys. 2-14).



Rys. 2-14 Elektroprzędzenie w układzie rdzeń – osnowa. Z pionowej strzykawki pompowany jest roztwór polimeru PLC tworzący osnowę nanowłókna. Z drugiej strzykawki pompowany jest wodny roztwór czynnika wzrostu w 4% wag. PEOX tworzący strukturę rdzenia nanowłókna [I, II].

Do sporządzenia roztworu rdzenia wykorzystano polimer PEO 4% wag. względem wody w 0,01M buforze PBS z odpowiednią ilością białka β -NGF i BDNF. Dodatek PEO miał za zadanie zwiększyć lepkość roztworu i jednocześnie spowodować przędność rdzenia. Dodatkowo jako czynnik osłaniający białko oraz zwiększający lepkość roztworu rdzenia dodano glicerynę stanowiącą 25% wag. roztworu rdzenia. Roztwór polimeru PLC 9% wag. rozpuszczony w mieszaninie DMF i CHCl₃ (1:9 wag./wag.) został użyty do utworzenia osnowy (powłoki) nanowłókna. Stężenie czynników wzrostu w wykonanych materiałach z

nanowłókien wynosi ok. 5 – 30 ng/cm² materiału. Dane dotyczące wykonanych materiałów umieszczono w tabeli 2-1.

Nr	Metoda	Lek	Stężenie leku	Masa	Ilość fazy	Ilość gliceryny	Grubość włókien
maty	elektorprzędzenia			surraktantu	woanej		
M1	z emulsji	β-NGF	10 ng/1cm² maty	40mg	50mg	brak	0,97±0,15 μm
M2	z emulsji	β-NGF	5 ng/1cm² maty	40mg	25mg	brak	1,02 ± 0,11 μm
M3	z emulsji	β-NGF	30 ng/1cm² maty	40mg	150mg	brak	0,68±0,15µm
M4	z emulsji	β-NGF	10 ng/1cm² maty	20mg	50mg	brak	0,86 ± 0,20 µm
M5	Rdzeń – osnowa	β-NGF	10ng/1cm ² maty	brak	-	25% roztworu rdzenia	2,15 ± 1,42 μm
Mó	Rdzeń – osnowa	β-NGF	10ng/1cm ² maty	brak	-	brak	1,22 ± 0,36 µm
M7	z emulsji	BDNF	10ng/1cm ² maty	20mg	50mg	brak	1,28 ± 0,41 μm
M8	z emulsji	BDNF	10ng/1cm ² maty	40mg	50mg	brak	1,57±0,65 μm
M9	z emulsji	BDNF	15ng/1cm ² maty	20mg	75mg	brak	1,33±0,20 μm

Tabela 2-1. Numeracja poszczególnych materiałów z nanowłókien i ich charakterystyka [I, II]..

Podczas elektroprzędzenia emulsji z czynnikiem aktywnym, przepływ roztworu polimeru wynosił 500 µl/h (elektroprzędzenie z użyciem pojedynczej igły). Parametry przepływu w przypadku elektroprzędzenia typu rdzeń – osnowa wynosiły: przepływ płynu wewnętrznego (rdzeń) – 500 µl/h, przepływ płynu zewnętrznego (osnowa) – 2000 µl/h. Dodatni potencjał elektryczny przyłożony do dyszy wynosił 0,75 kV/cm, zaś odległość pomiędzy dyszą a kolektorem zbierającym nanowłókna wynosiła 20 cm. W przypadku elektroprzędzenia emulsji rozmiar igły wynosił 26 G zaś jej średnica wewnętrzna 0,6 mm. W przypadku elektroprzędzenia typu rdzeń osnowa wykorzystano dwie igły o rozmiarach 20G i 27G. Mniejszą igłą (20G) przebijano polimerową część drugiej igły, a następnie z użyciem mikroskopu koncentrycznie ustawiano jedną igłę w drugiej pozostawiając mniejszą igłę wysuniętą na około 0,5 mm. Tworzone nanowłókna zbierano na uziemiony obrotowy bęben (2000 obr/min) pokryty aluminiową folią.

2.4.3. Obrazowanie SEM

Morfologię włókien obrazowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Scanning Electron Microscopy – SEM, Jeol, JSM 6390 LV, Japonia). Przed obrazowaniem, materiały pokryto złotem przy użyciu napylarki (SC 7520, Polaron, Wlk. Brytania). Grubość włókien określono ze zdjęć mikroskopii optycznej w programie ImageJ (National Institute of Health, USA). Średnia grubość włókien w poszczególnych materiałach została przedstawiona w tabeli 1. Rozkład średnic w przypadku materiałów elektroprzędzonych z emulsji wykonano mierząc 25 włókien zbieranych na szkiełka mikroskopowe, gdyż bezpośrednia obserwacja włókien w materiałe była niemożliwa jak pokazano na rysunkach 2-5, 8-10. W przypadku dwóch materiałów elektroprzędzonych w układzie rdzeń – osnowa dokonano pomiaru grubości 100 włókien z powierzchni materiałów.

2.4.4. Uwalnianie czynników wzrostu z nanowłókien

Aby określić ilość uwolnionego leku, materiały zostały pocięte na kawałki o powierzchni 1cm² i zważone. Czynniki wzrostu uwalniano w 1 ml 0,01M buforze PBS z 1% wag. BSA osłaniającym uwalniane czynniki wzrostu. Fiolki z umieszczonym materiałem przetrzymywano w temperaturze 37°C i w określonych punktach czasu przesącz zastępowano świeżym płynem a próbki mrożono w temperaturze -25°C. Z uwagi na szybki przebieg uwalniania czynników wzrostu, na początku przesącz wymieniano codziennie, cały proces uwalniania trwał 3 tygodnie. Uwolnione białka β -NGF i BDNF oznaczono przy użyciu testu immunoenzymatycznego (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA) firmy R&D Systems (nr kat. DY556, DBD00). Po zakończeniu uwalniania, próbki z przesączem rozmrożono i poddano analizie zgodnie z protokołem postępowania dostarczonym przez producenta.

2.4.5. Wyniki

Obrazy SEM nanowłókien

Na poniższych obrazach przedstawiono zdjęcia SEM materiałów i włókien zbieranych na szkiełka mikroskopowe. W przypadku materiałów elektroprzędzonych z emulsji, widoczne jest zespolenie włókien spowodowane nie całkowitym odparowaniem rozpuszczalnika organicznego podczas elektroprzędzenia zaś późniejszym odparowaniem z zebranego na kolektorze materiału. W celu przedstawienia rozkładu grubości włókien, podczas elektroprzędzenia zbierano włókna na szkiełka mikroskopowe w odległości od dyszy zbliżonej do odległości kolektora tak aby otrzymać reprezentatywną próbkę.



Rys.2-15 Obrazy SEM wierzchu materiału M1 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej) [I, II].



Rys.2-16 Obrazy SEM wierzchu materiału M2 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej) [I, II].



Rys.2-17 Obrazy SEM wierzchu materiału M3 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej) [I, II].



Rys.2-18. Obrazy SEM wierzchu materiału M4 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej) [I, II].



Rys.2-19. Obrazy SEM wierzchu materiału M5 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej) [I, II].



Rys.2-20. Obrazy SEM wierzchu materiału M6 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej) [I, II].



Rys.2-21. Obrazy SEM wierzchu materiału M7 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej) [I, II].



Rys.2-22. Obrazy SEM wierzchu materiału M8 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej) [I, II].



Rys.2-23. Obrazy SEM wierzchu materiału M9 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej) [I, II].

Profile uwalniania czynników wzrostu

Na poniższych wykresach przedstawiono profile uwalniania białek β-NGF i BDNF. Jak można zauważyć w ciągu 3 tygodni od rozpoczęcia uwalniania maksymalna procentowa ilość uwolnionych białek wynosi 16% (patrz. Rys.2-24.). W przypadku białka β-NGF zmiana zawartości surfaktantu poskutkowała wzrostem ilości uwolnionego białka w przypadku mniejszej ilości surfaktantu. W przypadku białka BDNF brak jest zauważalnych różnic w profilu uwalniania z obu materiałów. Większy udział fazy wodnej (stężenie białka w roztworze w każdym przypadku było takie samo) w materiale poskutkował zwiększeniem ilości uwolnionego białka. Przyczyną jest najprawdopodobniej większa obecność fazy wodnej przy powierzchni włókna i w konsekwencji ułatwiony transport do płynu.



Rys.2-24. Profile uwalniania białka β -NGF z materiałów o różnej zawartości surfaktantu (porównanie materiałów M1 i M4). Po lewej przedstawiono procent uwolnionego białka z materiału, po prawej masę uwolnionego białka w przeliczeniu na masę materiału [I, II].



Rys.2-25. Profile uwalniania białka β-NGF z materiałów o różnej zawartości fazy wodnej (porównanie materiałów M1 - M3). Po lewej przedstawiono procent uwolnionego białka z materiału, po prawej masę uwolnionego białka w przeliczeniu na masę materiału [I, II].



Rys.2-26. Profile uwalniania białka β-NGF z materiałów elektroprzędzonych różnymi metodami (włókna z emulsji i rdzeń - osnowa) oraz bez i z zawartością gliceryny w rdzeniu włókna (porównanie materiałów M1, M5, M6). Po lewej przedstawiono procent uwolnionego białka z materiału, po prawej masę uwolnionego białka w przeliczeniu na masę materiału [I, II].



Rys.2-27. Profile uwalniania białka BDNF z materiałów o różnej zawartości surfaktantu (porównanie materiałów M7 i M8). Po lewej przedstawiono procent uwolnionego białka z materiału, po prawej masę uwolnionego białka w przeliczeniu na masę materiału [I, II].



Rys.2-28. Profile uwalniania białka BDNF z materiałów o różnej zawartości fazy wodnej (porównanie materiałów M7 i M9). Po lewej przedstawiono procent uwolnionego białka z materiału, po prawej masę uwolnionego białka w przeliczeniu na masę materiału [I, II].

Wnioski:

Optymalizowano otrzymywanie elektroprzędzonych membran z biodegradowalnego poli(L-Laktydu-co-kaprolaktonu) (PLC)do zastosowania jako opatrunek neuroprotekcyjny do wykorzystania na modelu zwierzęcia laboratoryjnego – szczur. Optymalizowano otrzymywanie membran z tego polimeru zawierających alfa-tokoferol (przeciwutleniacz), jego analog – rodaminę B, oraz analog leków białkowych – albuminę surowicy wołowej. Uzyskano uwalnianie leków oraz czynniki wzrostu neuronów (NGF i BNDF) w czasie do 20 dni – istotnym z terapeutycznego punktu widzenia.

3. Zastosowanie mat z elektroprzędzonych nanowłókien jako aktywnego opatrunku do zapobiegania pourazowym zmianom w korze mózgowej na modelu zwierzęcym - szczur.

Poniżej przedstawiono badania na modelu zwierzęcym zastosowania mat z elektroprzędzonych nanowłókien jako opatrunku neuroprotekcyjnego. Wyniki opublikowano [I,III].

Powypadkowe i pooperacyjne urazy centralnego układu nerwowego prowadzą do bardzo poważnych konsekwencji społecznych i ekonomicznych. Wymagają one długotrwałego leczenia farmakologicznego, powodują postępującą degradację stanu zdrowia pacjentów, podwyższają koszty świadczeń społecznych i obciążenie systemu opieki zdrowotnej na obszarze Polski i Unii Europejskiej. Powstające w ich konsekwencji bliznowacenie, adhezja, zrosty zaburzają funkcjonalność układu nerwowego, są przyczyną niepożądanych objawów neurologicznych negatywnie wpływających na przebieg procesu zdrowienia. Dane kliniczne dotyczące procedur zapobiegających bliznowaceniu w obrębie mózgowia są dość skąpe. Nie są obecnie stosowane rutynowo żadne materiały zabezpieczające przed blizną w obrębie mózgowia, a dodatkowe materiały uszczelniające czy hemostatyczne np. Tachocomb czy Oxycel powstałe na bazie kolagenu zwierzęcego mogą wywołać miejscową reakcję na obce białko i odczyn wokół ciała obcego.

Brak skutecznej profilaktyki stał się powodem do rozpoczęcia badań nad nowym rodzajem materiałów do zastosowań klinicznych po urazach centralnego układu nerwowego. Wśród nowych metod terapeutycznych stosowanych w medycynie nanotechnologia wydaje się obecnie dziedziną bardzo obiecującą. Prowadzi się m.in. badania nad wykorzystaniem materiałów uzyskanych w tej technologii w charakterze barier po uszkodzeniu narządów i tkanek. Prowadzone wcześniej przez zespół Kierownika Projektu Profesora Tomasza Kowalewskiego z Instytutu Podstawowych Problemów Techniki PAN (IPPT PAN) prace badawcze nad zastosowaniem elektroprzędzonych mat w chirurgii plastycznej i urologii wypadły bardzo obiecująco. Korzystne oddziaływanie z tkanką, uzyskanych w drodze elektroprzędzenia mat z nanowłókien, skłoniły nas do poszukiwania potencjalnych zastosowań tego materiału w neurochirurgii. Choć prowadzone są już obecnie na świecie badania nad biomedycznym zastosowaniem procesu elektroprzędzenia, to brak jest jakichkolwiek doniesień o próbach powstrzymania degradacji kory mózgowej przez zastosowanie aktywnych opatrunków bazujących na biokompatybilnych nanowłóknach.

Charakterystyka wykorzystanych w badaniach nanomembran:

Otrzymywanie nanomembran oparte jest na procesie elektroprzędzenia. W procesie tym struga roztworu polimeru umieszczona w polu elektrycznym o wartości rzędu 0,2-2 kV/cm zaczyna wirować tworząc włókna (Kowalewski 2005). W zależności od użytego roztworu i warunków prowadzenia procesu włókna te mogą ulegać rozerwaniu tworząc drobne krople (atomizacja, elektrosprej), lub zastygać tworząc nanowłókna. Optymalizacja warunków prowadzenia procesu pozwala na uzyskanie włókien o średnicy 100-1000 nm i długości nawet kilkunastu centymetrów, skłębionych i tworzących siatkę (nanomembranę). Miejsca styku włókien mogą być ze sobą luźno powiązane lub stopione, co ma wpływ na możliwość penetracji tak utworzonej membrany. Uzyskana membrana, w zależności od liczby warstw oraz grubości tworzących ją włókien może mieć grubość od kilku do ok 50 mikrometrów.

Materiał (nanomembrany) stosowany w Projekcie wytworzony był według następujących procedur: 1) jako materiału użyto poli(L-Laktyd-co-kaprolakton, 70 % L-laktyd, 30 % kaprolakton) PLC (Purasorb 7015, Purac biochem by, Gorinchem, Holandia). Jest to materiał o obniżonej szybkości biodegradacji (w porównaniu z niemodyfikowanym poli-L-laktydem). Materiał ten posiada dopuszczenia medyczne do systemów uwalniania leków i protez. Materiał był rozpuszczony w układzie chloroform (CHCl3)/dimetyloformamid (DMF). Przykładowy masowy skład roztworu: PLLC - 500 mg, CHCl34700 mg, DMF- 300 mg.; 2) Do tworzenia membran wykorzystano zestaw do elektroprzędzenia składający się z zasilacza z regulowanym napięciem wyjścia DC 0-30kV, pompy strzykawkowej i zestawu hydraulicznego; 3) Roztwór materiału po rozpuszczeniu przechowywany był przynajmniej 12 godzin dla odseparowania i spęcznienia łańcuchów polimeru. Używano napięcia 15 kV, a odległość kolektora włókien 20 cm. Wydatek pompy wynosił 0,5 ml/h. Materiały przygotowywane były w temperaturze pokojowej (ok. 22-24°C).

Przeprowadzono również badania z wykorzystaniem nanomembran impregnowanych neuroprotekcyjnymi substancjami ochronnymi takimi jak alfa-tokoferol (ograniczający stres oksydacyjny). Podjęto próby zastosowania białkowych czynników neurotroficznych: NGF i BDNF.

Membrany z elektroprzędzonych nanowłókien ulegają degradacji w czasie ok 6 miesięcy (dane dla poli(kaprolaktonu)) [5], membrany z PLC były silnie zdegradowane już w czasie 60 dni, po wszczepieniu podskórnym lub dootrzewnowym [xx]. Wytwarzanie mat i uwalnianie z nich tokoferolu i czynników wzrostu opisano dokładnie w drugim rozdziale niniejszego raportu. Leki uwalniały się w czasie 2 do 3 tygodni.

3.1. Model eksperymentalny:

Badania prowadzone były na szczurzym modelu chirurgicznego uszkodzenia mózgu. Umożliwiły one prześledzenie i analizę mechanizmów naprawy i przebudowy kory mózgowej w wybranym czasie po uszkodzeniu mózgu.

Chirurgiczny uraz okolicy czołowo-skroniowej kory mózgowej szczura wykonywany był w stanie uśpienia ogólnego zwierzęcia i polegał na usunięciu kości i opony twardej i wycinka kory mózgowej o wielkości ok. 1mm x1mm x 1mm. Po zszyciu skóry i wybudzeniu zwierzę umieszczane było w standardowych warunkach zwierzętarni. W punktach czasowych określonych harmonogramem Projektu zwierzęta były usypiane a pobrane od nich tkanki przygotowywano do dalszych badań.

Badaniami objęto następujące grupy zwierząt:

- nanomembrana jako opatrunek

1. zwierzęta kontrolne nieoperowane, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

2. zwierzęta z operacją pozorowaną (tzw. sham), na których wykonane zostały opisane powyżej procedury eksperymentalne jedynie do etapu trepanacji czaszki, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3. zwierzęta z zastosowanymi biodegradowalnymi powłokami z nanowłókien na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

4. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym kory mózgowej (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

5. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym z raną pooperacyjną pokrytą elektroprzędzonymi biodegradowalnymi powłokami (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

- nanomembrana jako opatrunek aktywny - uwalniający tokoferol

1. zwierzęta kontrolne nieoperowane, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

2. zwierzęta z operacją pozorowaną (tzw. sham), na których wykonane zostały opisane powyżej procedury eksperymentalne jedynie do etapu trepanacji czaszki, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3. zwierzęta z zastosowanymi biodegradowalnymi powłokami z nanowłókien zawierającymi tokoferol w dawce 5% na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

4. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym kory mózgowej (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

5. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym z raną pooperacyjną pokrytą elektroprzędzonymi biodegradowalnymi powłokami zawierającymi tokoferol w dawce 5% (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

<u>- nanomembrana jako opatrunek aktywny - uwalniający czynnik troficzny czynnik</u> wzrostu nerwów - NGF

1. zwierzęta kontrolne nieoperowane, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3. Zastosowanie nanowłókien jako aktywnego opatrunku

2. zwierzęta z operacją pozorowaną (tzw. sham), na których wykonane zostały opisane powyżej procedury eksperymentalne jedynie do etapu trepanacji czaszki, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3. zwierzęta z zastosowanymi biodegradowalnymi powłokami z nanowłókien zawierającymi NGF w dawce 0,02 % (10 ng/cm2 maty)na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

4. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym kory mózgowej (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

5. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym z raną pooperacyjną pokrytą elektroprzędzonymi biodegradowalnymi powłokami zawierającymi NGF w dawce 0,02 % (10 ng/cm2 maty)(czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

<u>- nanomembrana jako opatrunek aktywny - uwalniający czynnik troficzny</u> pochodzenia mózgowego - BDNF

1. zwierzęta kontrolne nieoperowane, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

2. zwierzęta z operacją pozorowaną (tzw. sham), na których wykonane zostały opisane powyżej procedury eksperymentalne jedynie do etapu trepanacji czaszki, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3. zwierzęta z zastosowanymi biodegradowalnymi powłokami z nanowłókien zawierającymi BDNF w dawce 0,02 % (10 ng/cm2 maty)na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej, (czas przeżycia: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

4. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym kory mózgowej (czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

5. zwierzęta po wykonanym urazie chirurgicznym z raną pooperacyjną pokrytą elektroprzędzonymi biodegradowalnymi powłokami zawierającymi BDNF w dawce ...(czas przeżycia po operacji: 4, 7, 14, 30 i 60 dni);

3.2. Cele przeprowadzonych badań:

Pierwszym etapem prowadzonych badań była optymalizacja (przy pomocy metod mikroskopowych optycznych i elektronowych) metod wytwarzania elektroprzędzonych nanowłókien do zastosowania jako opatrunki i opatrunki aktywne impregnowane neuroprotekcyjnymi substancjami ochronnymi (alfa-tokoferol, białkowe czynniki neurotroficzne: NGF i BDNF).

Kolejnym celem było określenie cech elementów złącza nerwowo-naczyniowego mózgu szczura po urazie chirurgicznym oraz zastosowaniu biodegradowalnych nanomembran we wszystkich grupach eksperymentalnych.

Wykorzystanie technik immunohistochemicznych miało na celu ocenę uszkodzenia i wywołanej nim odpowiedzi komórkowej (komórek nerwowych, glejowych i śródbłonkowych) po urazie chirurgicznym kory mózgowej oraz po zastosowaniu biodegradowalnych powłok z elektroprzędzonych nanomembran, w wyznaczonych harmonogramem badań czasach po operacji we wszystkich grupach eksperymentalnych.

Ze względu na wprowadzenie do organizmu zwierząt ciała obcego (nanomembran) konieczna była ocena odpowiedzi zapalnej.

3.3. Uzyskane wyniki:

Wykorzystanie nanomembran jako opatrunku na korę mózgową szczura po uszkodzeniu

W materiale pozyskanym ze zwierząt kontrolnych nieoperowanych obserwowano prawidłową budowę morfologiczną wszystkich elementów złącza nerwowo-naczyniowego. Nie wykryto zmian degeneracyjnych dotyczących komórek parenchymy mózgowej.

Podobne wyniki pozyskano z materiału pochodzącego od zwierząt poddanych operacji pozorowanej (Sham).

Analiza materiału uzyskanego od zwierząt z powłokami zastosowanymi na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej wykazała, że opatrunek nie wywołuje większych zmian w badanych strukturach. Nie obserwowano śmierci komórek kory ani objawów reakcji zapalnej ze strony OUN (brak makrofagów oraz aktywacji mikro– i astrogleju). W okolicy aplikacji opatrunku wykryto jedynie niewielki wzrost liczby GFAP pozytywnych astrocytów, które jednak nie wykazywały cech hipertrofii. Otrzymane wyniki wskazują, że materiał cechuje biokompatybilność z tkanką.

W grupie zwierząt poddanych operacji neurochirurgicznej obserwowano masywną neurodegenerację i śmierć komórek nerwowych oraz astrogleju, najbardziej nasiloną w okresie od 4 do 14 dni po operacji. W badanej tkance zaobserwowano obecność komórek pozytywnie znakujących się dla nestyny. Wiele z nich charakteryzowało się morfologią typową dla astrocytów, ale tylko nieliczne wykazywały jednoczesną obecność immunosygnału dla GFAP. W tym samym czasie w badanym materiale znaleziono małą liczbę komórek pozytywnie wyznakowanych dla nestyny i NeuN (marker komórek nerwowych). Już we wczesnych punktach czasowych rejestrowano masywny napływ makrofagów (już w 4 dni po uszkodzeniu - średnio 46 makrofagów w obszarze 20 analizowanych mikroskopowych pól widzenia) (Tab. 3-1.).

	Kontrola							4 0	lni po	opera	icji	
	Szczur							Szc	zur			
	1 2 3 4 5 6					1	2	3	4	5	6	
Liczba makrofagów 0 1 0 1 0 1				1	44	47	42	49	51	43		

Tab. 3-1. Liczba makrofagów wykrytych w 20 polach widzenia w 6 szczurach na grupę po uszkodzeniu kory mózgowej [I, II, III].

Procesom tym towarzyszyło formowanie nowych naczyń kapilarnych w okolicy okołourazowej (Fig. 3-1. zdjęcie górne).



Kora mózgowa 4 dni po urazie i aplikacji siatki z nanowłókien



Fig. 3-1 Zdjęcie ultramikroskopowe kory mózgowej szczura 4 dni po urazie (zdjęcie górne, oraz 4 dni po urazie i aplikacji siatki z nanowłókien. V- nowe naczynie kapilarne. A- astrocyty [III].

Kora mózgowa 4 dni po urazie

W sąsiedztwie nowopowstających naczyń krwionośnych znajdowano znaczną ilość komórek pozytywnie znakujących się dla AC133/Flk1 (markerów niedojrzałych komórek śródbłonkowych) oraz metaloproteinaz: MMP2 i MMP9. Badania mikroskopowoelektronowe wykazały, iż komórki te posiadały w cytoplazmie nietypowe włókienka o grubości charakterystycznej dla filamentów pośrednich. Komórki te brały udział w formowaniu nowych naczyń.



Fig. 3-2. Blizna glejowa po urazie mózgu. Znakowanie na obecność GFAP (kwaśnego białka włókienkowego). A – Kontrola, B – 4 dni po operacji – rana nieopatrzona, C – 4 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem, D – 14 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem, E – 30 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem [I, III].

Badania immunohistochemiczne wykazały silną ekspresję białek przestrzeni zewnątrzkomórkowej: lamininy, kolagenu i fibronektyny w okolicy okołonaczyniowej. We wczesnych czasach pooperacyjnych dochodziło do masywnej astroglejozy oraz aktywacji komórek astrocytarnych. Astrocyty nabierały cech hipertrofii i tworzyły na powierzchni rany

rozległą bliznę glejową o "nieuporządkowanej" strukturze (Fig. 2 B, Fig. 3 B). Formowanie blizny glejowej obserwowano od 14 dnia po lezji.



Fig. 3. Graficzna analiza układu włókien i uporządkowania blizny glejowej. A – kontrola, B- Rana nieopatrzona, C- Rana opatrzona nanomateriałem [I, II, III]

Część z komórek tworzących bliznę wykazywała pozytywne znakowanie dla wimentyny – markera młodocianych form astrocytów (Fig.3-4 B).

3.Zastosowanie nanowłókien jako aktywnego opatrunku

Fig. 4. Blizna glejowa po urazie mózgu. Znakowanie na obecność wimentyny. A – Kontrola, B – 4 dni po operacji – rana nieopatrzona, C – 4 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem, D – 14 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem, E – 30 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem [II, III].

W 30 dni po urazie w badanej tkance pojawiały się cechy destabilizacji blizny oraz degeneracji wtórnej. Prowadziły one do atrofii tkanki w obszarze pierwotnie uformowanej blizny glejowej (60 dni po operacji).

Analiza materiału pozyskanego ze zwierząt z urazem zaopatrzonym opatrunkiem z nanowłókien wykazała brak zmian zapalnych we wszystkich badanych punktach czasowych (rejestrowano jedynie kilka makrofagów w 20 analizowanych polach widzenia), w przeciwieństwie do obserwacji poczynionych w grupie zwierząt z urazem.

Zaopatrzenie rany nanoopatrunkiem chroni więc uszkodzoną tkankę i redukuje znacznie proces zapalny. Przeprowadzono szczegółową analizę obszaru przyrannego u zwierząt z raną zaopatrzoną nanoopatrunkiem - ze szczególnym uwzględnieniem obecności komórek

zaangażowanych w odpowiedź układu immunologicznego organizmu. Uzyskane wyniki dotyczące obecności makrofagów w badanym obszarze przedstawione zostały zbiorczo w tabeli nr 3-2.

	Kontrola							4 0	lni po	opera	cji	
	Szczur							Szc	zur			
	1 2 3 4 5 6					1	2	3	4	5	6	
Liczba makrofagów	ngów 0 1 0 1 0 1				44	47	42	49	51	43		

Tab. 3-2. Liczba makrofagów(Lm) wykrytych w 20 polach widzenia w okolicy przyrannej kory mózgowej zwierząt z rana zaopatrzoną nanoopatrunkiem. Każdą grupę stanowiło 6 zwierząt [I, II, III].

Nie obserwowano formowania nowych naczyń ani masywnej blizny glejowej (Fig. 3-1 dolne zdjęcie; Fig. 3-2 C, D i E; Fig 3-3 C oraz Fig 3-4 C, D i E). Wykryto niewielką indukcją astogleju (GFAP i Wimentyno-pozytywny) oraz tworzenie się subtelnej, ledwie zarysowanej blizny na powierzchni uszkodzonej kory mózgowej. Część z tworzących ją komórek wykazywała pozytywne znakowanie dla wimentyny. Wyniki te wykazują, że nanosiatka posiada właściwości modulujące proces bliznowacenia. Dodatkowo maty z nanowłókien hamowały krwawienie po wykonanym zabiegu. Otrzymane wyniki wskazują, że materiał zastosowany w badaniach w terapii pourazowej układu nerwowego cechuje nie tylko biokompatybilność z tkanką ale również działanie hemostatyczne. Jak wspomniano, po zaopatrzeniu rany opatrunkiem z nanowłókien nie dochodzi do procesu angiogenezy przyrannej. Mechanizm tego zjawiska wymaga dalszych badań.

3.4. Wykorzystanie nanomembran jako opatrunku aktywnego na korę mózgową szczura po uszkodzeniu

Kolejnym etapem prowadzonych eksperymentów było zbadanie efektów zastosowania mat z nanowłókien jako opatrunków aktywnych – uwalniających w miejscu uszkodzenia czynniki neurotroficzne i potencjalnie neuroprotekcyjne.

Uzyskane dotychczas wyniki wskazują, że zastosowanie mat z nanowłókien zawierających tokoferol (Fig. 3-5), NGF i BDNF na nieuszkodzoną korę mózgową nie wywołuje reakcji zapalnej ani śmierci komórek.

Szczegółowa analiza materiału pozyskanego od zwierząt operowanych z raną zaopatrzoną membranami zawierającymi tokoferol, NGF lub BDNF nie wykazała wpływu uwalnianych czynników na stan tkanki nerwowej. Elementy złącza nerwowo-naczyniowego posiadały cechy występujące w grupie zwierząt poddanych operacji i zaopatrzonych membraną niezawierającą czynnika protekcyjnego (opatrunek nieaktywny).

3. Zastosowanie nanowłókien jako aktywnego opatrunku

Fig. 3-5. Prawidłowa budowa morfologiczna kory mózgowej szczura poddanego operacji pozorowanej (sham) z zaaplikowaną matą z nanowłókien uwalniającą tokoferol [I, II, III].

Uzyskane wyniki sugerują protekcyjne działanie samej membrany z nanowłókien. Przypuszczamy, że protekcyjny charakter membran może wynikać z faktu, iż produktem ich biodegradacji są mleczany, których pozytywny wpływ na tkankę nerwową był opisywany w literaturze. Ponadto struktura przestrzenna zastosowanych nanomembran może imitować właściwą strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej promując prawidłowe gojenie ran i ograniczając obszar powstającej blizny.

3.5. Wnioski

Zastosowanie materiałów w postaci nanomembran w obrębie strefy urazu ośrodkowego układu nerwowego może być wykorzystane jako forma terapii, ponieważ wpływa korzystnie na miejscowe procesy pourazowe, modyfikuje miejscowe reakcje komórkowe, stwarza barierę izolacyjną uniemożliwiając napływ fibroblastów oraz zmniejsza bliznowacenie. Ponadto, czas degradacji nanomateriału może zostać zaplanowany w procesie wytwarzania, a produkty są metabolitami charakterystycznymi dla tkanek organizmu (mleczany) co wpływa na brak toksyczności miejscowej oraz ma działanie protekcyjne dla układu nerwowego. Po przeprowadzeniu w przyszłości udanych badań przedklinicznych na ludziach materiał będzie mógł znaleźć zastosowanie podczas operacji neurologicznych

4. Podsumowanie

Najważniejszym osiągnięciem wykonanej pracy jest zakończone sukcesem zastosowanie membrany z elektroprzędzonych nanowłókien jako opatrunku neuroprotekcyjnego w operacjach mózgu. Ważnym wynikiem pracy jest konstrukcja wielofunkcyjnej nowatorskiej aparatury służącej do otrzymywania elektroprzędzonych nanowłókien jak również szereg publikacji, zgłoszeń patentowych i wystąpień konferencyjnych. Dotyczyły one analizy i optymalizacji otrzymywania włókien oraz ich zastosowania jako systemów uwalniania leków oraz w neurologii.

Badania nad wprowadzeniem leku lub substancji lekopodobnej do elektroprzędzonych nanowłókien miały na celu uzyskanie stopniowego uwalniania w okresie 10-21 dni; ważnym z terapeutycznego punktu widzenia. Przebadano materiały zawierające rodaminę lub błękit metylenowy jako odpowiedniki leków o średniej masie cząsteczkowej oraz fluorescencyjnie znakowaną albuminę jako odpowiednik leków białkowych. Znaleziono **optymalne** ich **zawartości i sposoby tworzenia nanowłókien**. Wykonano eksperymenty **uwalniania do symulowanej tkanki mózgowej** (substancji o właściwościach zbliżonych do mózgu), wyniki dopasowano do numerycznego modelu procesu uwalniania leków. Tak opracowane układy zastosowano do opracowania systemów uwalniania leków: alfa-tokoferolu, czynnika wzrostu neuronów, czynnika neurotropowego pochodnego mózgu.

Największym osiągnięciem praktycznym było zastosowaniu mat z nanowłókien zawierających leki jako aktywnego opatrunku do zapobiegania pourazowym zmianom w tkance mózgowej. Przeprowadzone oryginalne badania pokazały bardzo dobre rezultaty dla zastosowania elektroprzędzonych membran wykonanych z biodegradowalnych poliestrów. Eksperymentalnie stwierdzono, że membrana z elektroprzędzonych nanowłókien wykazuje aktywne działanie chroniące tkankę mózgową przed pourazową neurodegeneracją.

5. Spis własnych publikacji powstałych w związku z realizacją grantu.

- I. Tomasz Kowalczyk, *Elektroprzędzenie nanowłókien. Badania podstawowe i zastosowania biomedyczne*, IPPT Reports on Fundamental Technological Research, 5/2013, Instytut Podstawowych Problemów Techniki Polska Akademia Nauk, , ISBN 978-83-89687-85-2
- II. Paweł Nakielski, Systemy uwalniania leków oparte na nanowłoknach polimerowych, Praca doktorska (w przygotowaniu)
- III. Sulejczak D., Andrychowski J., Kowalczyk T., Nakielski P., Frontczak-Baniewicz M., Kowalewski T. *Electrospun nanofiber mat as a protector against the consequences of brain injury*, Folia Neuropathol, in print IF=1,547
- IV. Paweł Nakielski, Tomasz Kowalczyk, Tomasz A. Kowalewski *Drug delivery system based on polymer nano-fibers*. IPPT Reports 4c/2013
- V. Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., *Modeling drug release from materials* based on electrospun nanofibers, COMSOL Conference Rotterdam 2013

Prace przygotowywana do wysłania

- VI. Nakielski P., *Symulacje numeryczne procesu desorpcji i dyfuzji leku w materiale z nanowłókien*, Modelowanie Inżynierskie (po pozytywnej recenzji
- VII. Nakielski P., Kowalczyk T., Zembrzycki K., Kowalewski T. A., *Evolution of model drug release from nanofibers*, IEEE Trans Biomed Eng (wysłany do recenzji)

Prace konferencyjne:

- VIII. Kowalczyk T., Nakielski P., Chmielewski T., Andrychowski J., Frontczak-Baniewicz M., Sulejczak D., Kowalewski T.A, Zastosowanie nanowłókien w medycynie, Konferencja z okazji 60-lecia PAN, Powsin, 24 maja 2012
 - IX. Kowalczyk T., Gołąbek-Sulejczak D., Frontczak-Baniewicz M., Grieb P., Kowalewski T.A., *Electrospun nanofibrous nets as potential materials for neurology*, Molecular Basis of Pathology and Therapy in Neurological Disorders The 10th International Symposium, Warsaw, November 25-26, 2010, Acta Neurobiol Exp, 71, SIII-P15, 2011
 - X. Kowalczyk T., Kowalewski T.A., The Research on Application of Electrospun Nanofibrous Mats as Active Wound Dressing for Prevention of Post-Accidental

5. Spis własnych publikacji powstałych w związku z realizacją grantu.

Damage in the Therapy of the Traumatic Brain Injury (TBI), Managing Innovation, Warsaw, Poland, 22-24 Sept. 2010

- XI. Kowalczyk T., Nakielski P., Kowalewski T.A. Application of nanofibers as Drug Delivery Systems, Book of Abstracts, III National Conference of Nano and Micromechanics 4-6 VI 2012, Warszawa 39-40
- XII. Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A. *Experimental study of drug release system based on electrospun nanofibers*, Book of Abstracts, III National Conference of Nano and Micromechanics 4-6 VI 2012, Warszawa 149-150
- XIII. Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., Experimental study of drug release system based on electrospun nanofibers, Proceedings of the 23rd International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, Eds:Y. Bai, J. Wang, D. Fang, Beijing, 19-24 August CD-ROM FS10-007, 2012
- XIV. Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., Nanofibrous mats as a protective materials in neurosurgery, Nano and Advanced Materials Workshop and Fair, Warszawa, 18-19 września 2013
- XV. Kowalewski T.A., Kowalczyk T., Nakielski P., Frontczak-Baniewicz M., Sulejczak D., Andrychowski J., Application of Nanofibres for Biomedical Diagnostics and Therapy, Swiss Soft Days 12, Bern, 14 października 2013
- XVI. Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., Experimental analysis of drug release process from nanofibrous mats, Experiments In Fluid Mechanics Symposium, Warszawa, 14-15 października 2013
- XVII. Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., Modeling drug release from materials based on electrospun nanofibers, COMSOL Conference Rotterdam 2013, 23-25 października 2013
- XVIII. Kowalczyk T., Nakielski P., Frontczak-Baniewicz M., Sulejczak D., Andrychowski J., Adamowicz J., Drewa T., Kowalewski T.A., *Electrospun nanofibers applied for tissue engineering and medical therapies*, Institute of Physics; Electrospinning, Principles, Possibilities and Practice, Londyn, 5-6 grudnia 2013
 - XIX. Kowalewski T.A., Nanowłókna polimerowe w zastosowaniach biomedycznych, Sympozjum "Od czego zacząć? – droga do badań stosowanych, IBD PAN, Warszawa, 21 grudnia 2012

Zgłoszenia patentowe

XX. P404667/2013-07-12 Andrychowski J, Frontczak-Baniewicz MM, Czernicki ZM, Gołąbek-Sulejczak DA, Kowalczyk T, Kowalewski TA, Nakielski P. Zastosowanie opatrunków z nanowłókien polimerowych w zapobieganiu pourazowym zmianom w mózgu.

50

Literatura

- 1. Reneker D. H., Kataphinan W., Theron A., Zussman E., Yarin A. L., *Nanofiber Garlands Of Polycaprolactone By Electrospinning*, Polymer 43, 6785-6794, (2002).
- Blonski S., Blasinska A., Kowalewski T. A., *Electrospinning Of Liquid Jets*, conference proceedings, XXI International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, Warsaw, Poland, 15-21 August 2004.
- 3. <u>http://fluid.ippt.gov.pl/sblonski/nanofibres.html</u> Strona Sławomira Błońskiego o elektroprzędzeniu.
- 4. Dayal P., Kyu T., Dynamics and morphology development in electrospun fibers driven by concentration sweeps., Phys. Fluids, 19, 107106, (2007).
- Bolgen N., Menceloglu Y. Z., Acatay K., Vargel I., Piskin E., In Vitro And In Vivo Degradation Of Non-Woven Materials Made Of Poly(E-Caprolactone) Nanofibers Prepared By Electrospinning Under Different Conditions, J. Biomater. Sci. Polymer Edn, 16 (12), 1537-1555, (2005).
- 6. Breitenbach A., *Comb Polymers For Biomedical Application Obtained By Grafting Biodegradable Polyester Chains Onto Hydrophilic Polyol Backbones*, Ph.D. Thesis, Philipps-Universitat Marburg (2000).
- 7. Liang D., S. Hsiao B., Chu B., *Functional Electrospun Nanofibrous Scaffolds For Biomedical Applications*, Advanced Drug Delivery Reviews 59, 1392-1412, (2007).
- Courtney T., Sacks M. S., Stankus J., Guan J., Wagner W. R., Design And Analysis Of Tissue Engineering Scaffolds That Mimic Soft Tissue Mechanical Anisotropy, Biomaterials 27, 3631-3638, (2006).
- 9. Li M., Mondrinos M. J., R. Gandhia M., K. Ko F., S. Weiss A., I. Lelkes P., *Electrospun Protein Fibers As Matrices For Tissue Engineering*, Biomaterials 26, 5999-6008, (2005).
- 10 R. Kenawy E., M. Layman J., R. Watkins J., L. Bowlin G., A. Matthews J., G. Simpson D., E. Wnek G., *Electrospinning Of Poly(Ethylene-Co-Vinyl Alcohol) Fibers*, Biomaterials 24, 907-913, (2003).
- Pan H., Jiang H., Chen W., Interaction Of Dermal Fibroblasts With Electrospun Composite Polymer Scaffolds Prepared From Dextran And Poly Lactide-Co-Glycolide, Biomaterials 27, 3209-3220, (2006).
- K. Noh H., W. Lee S., Kim Jin-Man, Oh Ju-Eun, Kim Kyung-Hwa, Chong-Pyoung Chung, Soon-Chul Choi, Park W. H., Byung-Moo Min, *Electrospinning Of Chitin Nanofibers:* Degradation Behavior And Cellular Response To Normal Human Keratinocytes And Fibroblasts, Biomaterials 27, 3934-3944, (2006).
- 13. Venugopal J. R., Zhang Y., Ramakrishna S., In Vitro Culture Of Human Dermal Fibroblasts On Electrospun Polycaprolactone Collagen Nanofibrous Membrane, Artif Organs (2006).

- 14. Li W.-J., Cooper Jr. J. A., Mauck R. L., Tuan R. S., Fabrication And Characterization Of Six Electrospun Poly(w-Hydroxy Ester)-Based Fibrous Scaffolds For Tissue Engineering Applications, Acta Biomaterialia 377-385, (2006).
- 15. Srouji, S., Ben-David, D., Lotan, R., Livne, E., Avrahami, R., Zussman, E.. Slow-release human recombinant bone morphogenetic protein-2 embedded within electrospun scaffolds for regeneration of bone defect: in vitro and in vivo evaluation. Tissue Engineering Part A, 17(3-4), 269-277, (2010).
- Gandhi, M., Srikar, R., Yarin, A. L., Megaridis, C. M., & Gemeinhart, R. A.: Mechanistic examination of protein release from polymer nanofibers. Molecular pharmaceutics, 6(2), 641-647, (2009).
- 17. Srikar, R., Yarin, A. L., Megaridis, C. M., Bazilevsky, A. V., & Kelley, E. Desorptionlimited mechanism of release from polymer nanofibers. Langmuir, 24(3), 965-974, (2008).
- Qi H., Hu P., Xu J., Wang A., Encapsulation Of Drug Reservoirs In Fibers By Emulsion Electrospinning: Morphology Characterization And Preliminary Release Assessment, Biomacromolecules 7, 2327-2330, (2006).
- 19. Zeng J., Xu X., Chen X., Liang Q., Bian X., Yang L., Jing X., *Biodegradable Electrospun Fibers For Drug Delivery*, Journal of Controlled Release 92, 227-231, (2003).

xx Kowalczyk T., Kloskowski T., Jundziłł A., Drewa T. wyniki nieopublikowane

Wykonanie komory do elektroprzędzenia

Planowany zakup gotowej komory do elektroprzędzenia, spełniającej wszystkie oczekiwane wymagania okazał się niemozliwy do zrealizowania z uwagi na ograniczenia finansowe ale tez brak na rynku specjalistycznych wykonawców. W związku z tym specjalistyczna komora została w ramach projektu zaprojektowana i wykonana dla projektu w Centrum Usług Laboratoryjnych IPPT PAN. Poniżej przedstawiamy podstawowe charakterystyki tej konstrukcji.

1. Cel i ogólne założenia nowej komory.

Proces elektroprzędzenia i jego możliwe zastosowania są badane w IPPT PAN od wielu lat. Przeprowadzone eksperymenty ujawniły iż proces elektroprzędzenia roztworów polimerów i emulsji, a zatem charakterystyka i jakość otrzymanego materiału, są niezwykle czułe na warunki zewnętrzne a w szczególności na temperaturę otoczenia. Oczywistym stała się konieczność wytwarzania materiałów w stałej temperaturze w celu dokładniejszego ustalenia pozostałych parametrów oraz aby zapewnić zadowalającą powtarzalność wyników. Dodatkowo obniżenie temperatury procesu do ok. 0^OC umożliwi znaczne obniżenie szybkości parowania lotnego rozpuszczalnika co spowolni proces zasychania polimeru. Takie rozwiąże problem zatykania dyszy.

Kolejnym parametrem mającym wpływ na proces elektroprzęrzenia, w szczególności roztworów typu emulsja woda-olej, jest wilgotność względna otoczenia. Ma ona, obok temperatury, wpływ na szybkość parowania wody w strudze a co za tym idzie na strukturę końcowego materiału. Pożądane jest obniżanie wilgotności względnej oraz precyzyjny jej pomiar. Proces ten idzie w parze z jednoczesnym schładzaniem powietrza wewnątrz komory.

Na podstawie wielu doświadczeń stwierdzono również iż można znacznie zmniejszyć rozmiary nowej komory. Dotychczas używana komora miała znaczną pojemność, ok. 1m³, z której większość nie była wykorzystana.

Koniecznością stało się zastosowanie nowego, wielokanałowego, systemu dozującego roztwory. Dotychczasowy system hydrauliczno-mechaniczny pomimo szeregu zalet, posiada również wady. Część hydrauliczna wymaga częstej konserwacji i usuwania nagromadzonego powietrza, a zastosowane szklane tłoki są łatwe do uszkodzenia. Cały układ ma sporą inercję która powoduje doże opóźnienie zanim faktyczny wydatek dozownika dojdzie do wartości zadanej. Było to szczególnie odczuwalne przy małych wydatkach rzędu kilkuset mikrolitów na godzinę i stwarzało trudności przy ustaleniu optymalnego wydatku. Dodatkowo, z powodu rozpoczęcia eksperymentów nad układami typu core-shell, komora musi być wyposażona w 2 układy dozujące.

Poza zapewnieniem wyżej wymienionych wymogów, nowa komora musi dodatkowo zapewnić inne własności użytkowe. Eksperymenty z przędzeniem materiałów biologicznych stwarza konieczność wyposażenia komory w prosty system dezynfekcji. Czystość w komorze powinna być łatwa w utrzymaniu. Z uwagi na stosowanie agresywnych rozpuszczalników w roztworach, elementy komory muszą być na nie odporne, oraz musi istnieć szybki sposób jej wentylacji. Aby możliwa stała się wydajna praca, proces chłodzenia i stabilizowania do zadanej temperatury nie powinien zajmować dłużej niż 30min. Całością

2. Ogólna konstrukcja komory.

Ogólny wygląd komory przedstawiono na Rysunku 1. Przestrzeń robocza komory ma wymiary 500x500x600mm (szer. x gł. x wys.) a jej ściany wykonane są z płyt plexiglasu o grubości 5mm, całość tworzy komorę roboczą.

Fig. 1. Ogólny wygląd komory wraz z dwoma układami dozującymi. Na rysunku nie przedstawiono agregatu chłodniczego.

Pomiędzy komorą roboczą a ścianami izolującymi znajduje się płaszcz chłodzący o grubości 220mm. Ściany izolujące wykonane są z dwóch płyt plexiglasu o grubości 5mm oddzielonych od siebie warstwą powietrza o grubości 16mm. Cała przednia ściana jest otwierana co umożliwia łatwy dostęp do wnętrza przestrzeni roboczej. Od góry oraz od lewej strony znajdują się po dwa porty na urządzenia dozujące. Taka konfiguracja umożliwia elektroprzędzenie w pozycji pionowej, poziomej bądź ich kombinacji. Obok portu na urządzenia dozujące znajduje się podłączenie kabla wysokiego napięcia. W centralnej części tylnej ściany komory roboczej znajduje się czujnik temperatury i wilgotności firmy Sensirion AG model SHT71. Wszystkie ściany komory są przezroczyste dzięki czemu można łatwo

oświetlać proces elektroprzędzenia co bardzo ułatwia, poprzez wzrokową obserwację, na ocenę jakości procesu.

W tylnej części komory na tylnej ścianie izolującej znajduje się chłodnica powietrza wraz z wentylatorem dużej wydajności. Po drugiej stronie znajduje się zespół agregatu chłodniczego. Również na tej ścianie znajdują się porty wentylacyjne wejściowy i wyjściowy. Tylna ściana izolująca, moduł agregatu chłodniczego oraz chłodnica powietrza z wentylatorem stanowią monolit wykonany na zamówienie przez "Przedsiębiorstwo Produkcji Urządzeń Chłodniczych Tarczyn Sp. z o.o.". Całość jest mocowana do komory czterema klamrami i w razie konieczności, np. celem wyczyszczenia kanałów chłodniczych, możne być odłączona.

Na lewej ścianie w dolnej części znajduje się zespół przyłączy uziemienia, kontrolera oraz urządzeń peryferyjnych.

Podstawę komory stanowi płyta z pleksiglasu pod która znajdują się płyty styrodurowe. Całość opiera się na spawanej aluminiowej ramie. Taka konstrukcja zapewnia zarówno odpowiednią nośność podstawy jak i odpowiednią izolacje cieplną.

3. Przestrzeń robocza komory.

Fig 2. Komora robocza, widok od przodu (bez drzwi), widok z lewego boku, widok góry.

Schemat przestrzeni roboczej komory przedstawiono na rysunku 2. Wszystkie ściany komory roboczej wykonane są z pleksiglasu o grubości 5mm. Przestrzeń wewnętrzna ma wymiary: szerokość 500mm, głębokość 500mm, wysokość 600mm. Takie rozmiary były podyktowane koniecznością zminimalizowania przestrzeni w której zachodzi proces elektroprzędzenia przy jednoczesnym zachowaniu jego parametrów.

Zawartość urządzeń wewnątrz komory roboczej zminimalizowano do minimum. Wstępne testy wykazały iż parametry elektroprzędzenia nie zmieniają się przy takich wymiarach komory. Wewnątrz przestrzeni roboczej nie znajdują się żadne zbędne elementy metalowe lub przewodzące, większość elementów wykonano z pleksiglasu. Podstawa została wyłożona płytą z polietylenu co zapewnia jej odporność na rozpuszczalniki chemiczne stosowane w eksperymentach.

Drzwi stanowią całą przednią ścianę komory, dzięki czemu przed eksperymentem można łatwo ustawić cały niezbędny sprzęt do eksperymentu. Drzwi są przezroczyste, dwuwarstwowe, wykonane z dwóch płyt pleksiglasu o grubości 5mm między którymi znajduje się warstwa powietrza o grubości 16mm. Dwa porty z rękawicami umożliwiają swobodną manipulacje urządzeniami wewnątrz komory w czasie eksperymentu kiedy chłodzenie jest włączone. Rękawice wykonane są z Vitonu ®, co zapewnia im odporność wiele rozpuszczalników chemicznych w tym na najczęściej stosowany chloroform. System mocowania samych rękawic pozwana na łatwą ich wymianę w razie ich uszkodzenia lub zużycia.

Na górnej oraz lewej ścianie znajdują się porty na dozowniki strzykawkowe wykonane z polietylenu, po dwa na ścianę. Dozowniki można zamontować w dowolnej konfiguracji. W pobliżu portów dozowników znajdują się przyłącza generatora wysokiego napięcia, po jednym na ścianie lewej i górnej, wykonane z polietylenu.

Na lewej ścianie w jej dolnej części znajdują się porty uziemień dla urządzeń i elektrod używanych w czasie eksperymentu. Również tam znajdują się dwa trójbolcowe złącza umożliwiające na podłączenie zasilania lub sygnałów elektrycznych z zewnątrz do wnętrza komory.

Na tylnej ścianie komory roboczej w jej środkowej części znajduje się czujnik temperatury i wilgotności firmy Sensirion AG model SHT71. W celu zabezpieczenia czujnika przed ładunkami statycznymi został on zabudowany w osłonę z pleksiglasu (z otworami umożliwiającymi pomiary) oraz dodatkowo w pierścień z uziemionego drutu. Na rogach ściany znajdują się klapy wentylacyjne. W czasie eksperymentu, przed rozpoczęciem procesu elektroprzędzenia, w celu szybkiego schłodzenia komory i obniżenia wilgotności, klapy otwierają się dzięki czemu wentylowane jest zarówno wnętrze komory jak i płaszcz chłodzący. Po ustabilizowaniu się temperatury klapy zamykają się (powiewy powietrza wewnątrz komory uniemożliwiłyby elektroprzędzenie) i komora jest gotowa do rozpoczęcia elektroprzędzenia. Po zakończeniu procesu, klapy ponownie otwierają się wraz z portami wentylacyjnymi na ścianie agregatu. Umożliwia to wentylację komory i usunięcie, powstałych podczas eksperymentu par rozpuszczalników.

4. Płaszcz chłodzący.

Fig 3. Schemat płaszcza chłodzącego.

W czasie eksperymentu, kiedy klapy na tylnej ścianie komory roboczej są zamknięte, temperatura, w jej wnętrzu, utrzymywana jest poprzez płaszcz chłodzący, znajdujący się pomiędzy komorą roboczą a ścianami izolującymi od strony lewej, prawej od góry i od tyłu. Schemat płaszcza chłodzącego przedstawiono na rysunku 3.

Od lewej i prawej i górnej strony grubość warstwy powietrza wynosi 220mm. Z tyłu komory, z uwagi na obecność chłodnicy przestrzeń ta jest większa. W czasie projektowania komory rozważano różne konfiguracje kanałów wewnątrz płaszcza (Załącznik 2). Z uwagi na dużą wydajność wentylatora chłodnicy oraz mając na uwadze konieczność łatwego czyszczenia wnętrza płaszcza, zdecydowano się nie montować dodatkowych kanałów kierujących powietrze.

Od strony zewnętrznej płaszcz jest izolowany ścianami izolującymi wykonanymi z dwóch płyt pleksiglasu o grubości 5mm oddalonych od siebie o 16mm, między którymi znajduje się warstwa suchego powietrza. W czasie montażu ścian do ich wnętrza wpuszczono suche powietrze w celu uniknięcia kondensacji wody wewnątrz ścian, co z kolei utrudniło by obserwację eksperymentu.

W tylnej części płaszcza nad wentylatorem zamontowane lampę UV-C. Może ona być włączona w dowolnym momencie w celu dezynfekcji powietrza wewnątrz komory. Z uwagi na zakłócenia pola elektrycznego, wpływające negatywnie na proces elektroprzędzenia, niemożliwe było zamontowanie lampy wewnątrz samej przestrzeni roboczej (przetestowano również i taką konfigurację).

5. Zespół chłodzący.

Moduł agregatu chłodniczego oraz chłodnica powietrza zostały wykonane na zamówienie przez "Przedsiębiorstwo Produkcji Urządzeń Chłodniczych Tarczyn Sp. z o.o." Wraz ze ścianą tylną, izolującą, stanowią one monolit mocowany do reszty komory od tyłu czterema kalmarami. W razie konieczności, np. celem wyczyszczenia płaszcza chłodzącego, cały zestaw chłodzący można łatwo odłączyć.

Chłodnica powietrza wyposażona jest w wysokowydajny wentylator zapewniający wysoki przepływ powietrza konieczny do szybkiego schłodzenia komory. Dodatkowo chłodnica została wyposażona w system odszraniania, uruchamiany w razie konieczności.

Zespół agregatu chłodniczego znajduje się po drugiej stronie tylnej ściany izolującej. System został wyposażony w 2 dysze, mniejszą i większą, sterowane elektrycznie przez kontroler. Otwieranie lub zamykanie dysz odbywa się w zależności od zapotrzebowania na moc chłodzenia.

Cały system zapewnia odpowiednią moc do schłodzenia całej komory od temperatury pokojowej 30°C do temperatury roboczej 0°C w czasie nie przekraczającym 30min. Zespół agregatu został również wyposażony w szereg zabezpieczeń zapewniających bezpieczną i bezawaryjną pracę.

6. Dozowniki.

Dwa identyczne dozowniki, wykonane zostały jako elementy mechaniczne, sterowane elektronicznie. Schemat dozownika przedstawiano na rysunku 4. Większość urządzenia znajduje się poza komorą co zapewnia minimalizację zakłóceń pola elektrycznego jak

również umożliwiło zmniejszenie rozmiarów samej komory. Z powodu niedogodności z systemem hydraulicznym, zastosowane dozowniki mają konstrukcję w pełni mechaniczną. Elementem wykonawczym jest silnik krokowy o skoku 9°, który napędza śrubę, o skoku 0.25mm, która popycha tłok strzykawki. Zastosowanie takich elementów w połączeniu z elektronicznym sterownikiem umożliwiającym podział kroku na dodatkowe 16 części zapewnia dużą precyzję oraz płynność ruch w szczególności przy małych wydatkach rzędu kilkuset mikrolitrów na godzinę. Dozownik wyposażony jest w system mocowania strzykawek jednorazowych o pojemności 1ml w których znajduje się roztwór do elektroprzędzenia. Zastosowanie powszechnie dostępnych strzykawek jednorazowych umożliwia szybką zmianę materiałów oraz ułatwia utrzymanie czystości. Elementy dozownika narażone na wysokie napięcia zostały wykonane z materiałów nieprzewodzących natomiast wszystkie elementy metalowe zostały uziemione. Urządzenie dodatkowo został wyposażony w system zatrzymujący pracę silnika w przypadku zatkania strzykawki. Praca obydwu dozowników jest niezależna i jest kontrolowana przez operatora z konsoli.

7. Elektroniczny sterownik komory.

Komora została wyposażona w szereg układów elektronicznych sterujących jej pracą jak również w generator wysokiego napięcia. Sterowanie całością odbywa się z konsoli. Może regulować między innymi temperaturę docelową, wartość przyłożonego napięcia, czas wyprzęgania oraz wydatek na poszczególnych dozownikach. Konsola zapewnia szybki dostęp do parametrów kluczowych dla procesu elektronarzędzia.

Fig 4. Schemat dozownika.

8. Testy i podsumowanie.

Po wstępnym skonstruowaniu komory przeprowadzony szereg testów. Test temperaturowy potwierdził zdolność urządzenia do osiągnięcia założonej temperatury pracy w czasie nie większym niż 30min. Natomiast minimalna osiągnięta temperatura wyniosła - 11^oC. Na rysunkach 5, 6 i 7 przedstawiono zdjęcia z części prób. Testy wykazały iż materiał wytworzony w nowej komorze nie odbiega jakością od materiałów uzyskanych w dotychczasowym urządzeniu w najlepszych warunkach, tzn. zimą przy niskich temperaturach i wilgotności.

Wykorzystanie nowego urządzenia pozwoli na otrzymywanie materiałów do badań o optymalnej jakości przez cały rok w jednorodnych warunkach uniezależniając się od najistotniejszych warunków zewnętrznych. Pozwoli również na przeprowadzenie badań przy parametrach nieosiągalnych do tej pory np. przy temperaturach poniżej zera stopni Celsiusza.

Fig 5. Zdjęcie przodu komory.

Fig 6. Zdjęcie zespołu agregatu chłodniczego komory.

Fig 7. Zdjęcie testu elektroprzędzenia. Po prawej stronie u dołu widoczny jest stożek Taylora.

Załącznik 2

Optymalizacja rozmieszczenia otworów wentylacyjnych w komorze elektroprzędzenia

1. Cel pracy

Celem przeprowadzonych symulacji numerycznych było znalezienie optymalnego rozmiaru i rozmieszczenia otworów wentylacyjnych komory elektroprzędzenia, tak aby uzyskać odpowiedni przepływ z dróg zasilających płaszcz chłodzący komory i w rezultacie równomierne chłodzenie komory przędnej. Wymiana ciepła nie była przedmiotem badań.

2. Wstęp

Zaprojektowano komore elektroprzedzenia z kontrola temperatury i możliwościa przędzenia w niskich temperaturach. Temperatura około 0°C umożliwia uniknięcie strat materiałowych dzięki spowolnieniu odparowywania łatwo wrzącego rozpuszczalnika ze stożka Taylora tworzonego pod dyszą do której przyłożone jest napięcie, dalszego zasychania polimeru i w konsekwencji zatykania dyszy do elektroprzędzenia. Inną sytuacją w której kontrola temperatury może być zasadna, jest elektroprzędzenie emulsji typu woda w oleju. Podczas elektroprzędzenia ww. emulsji, duża ilość roztworu polimeru z fazą rozproszoną w postaci kropel wody z lekiem wypływająca z dyszy, odrywa się od dyszy i tworzące się krople uderzają w elektroprzędzony materiał. W rezultacie otrzymujemy materiał z dużą ilością otworów z powodu obecności rozpuszczalnika w spadających kroplach. Tego typu sytuacja jest niepożądana i starano się jej unikać jedynie poprzez zmianę potencjału przyłożonego do dyszy. Zasychanie polimeru pod dyszą powoduje podobne problemy procesowe jak wymienione poprzednio. Częściowo zaschnięta kropla polimeru może opaść na elektroprzędzony materiał dziurawiąc go lub w najgorszym przypadku osadzając dużą ilość zaschniętego w polimerze leku na materiale. W tym przypadku potrzebna jest ciągła kontrola (co kilka minut) zatykania dyszy i usuwania zaschniętego polimeru przez obsługę, wyłączając ją z innych równoległych prac.

3. Geometria

Część komory w której prowadzony będzie proces elektroprzędzenia, otoczona płaszczem chłodniczym ma wymiar:

• wysokość 0,6 m

- szerokość 0,5 m
- głębokość 0,5 m

Grubość płaszcza otaczającego część przędną (płaszcz otacza boki, górę i tył części przędnej), w którym przepływać będzie powietrze z klimatyzatora wynosi 0,1 m (Fig 1). Objętość całego płaszcza wynosi 0,14 m³.

Fig. 1. Uproszczona geometria komory do elektroprzędzenia. Część przędna w której następuje proces elektroprzędzenia i zbieranie nanowłókien na kolektor oraz płaszcz chłodzący.

Wlot i wylot powietrza chłodzącego część przędną znajduje się w tylnej części, za częścią przędną. Kierunek wpadającego do płaszcza powietrza jest przeciwny do osi Z (Fig 1, niebieska strzałka). Aby ukierunkować przepływ powietrza w płaszczu, zastosowano prowadnice. Prowadzenie powietrza od wlotu do dołu komory przeprowadzono stosując nieperforowaną prowadnicę (Fig2). Pozostałe prowadnice zawierały wycięte otwory wentylacyjne do równomiernego chłodzenia komory. Na dolnej prowadnicy znajdowało się 7 otworów wentylacyjnych, na środkowej 11 oraz górnej 9. Zmianie podlegał jedynie wymiar otworów.

Fig. 2. Pełna geometria płaszcza komory zawierająca prowadnice. Czarnymi strzałkami zaznaczono wlot i wylot powietrza z płaszcza, czerwonymi prowadnice, niebieskimi kierunek przepływu powietrza przez płaszcz ograniczony prowadnicami.

Wykonano cztery różne geometrie różniące się rozmiarem otworów w prowadnicach powietrza oraz dodatkowo przeprowadzono jedną symulację ze zwiększonym przepływem powietrza.

Tab. 1. Promienie zastosowanych otworów w poszczególnych prowadnicach oraz wartość przepływu w układzie. Indeksy przy d, ś, g odnoszą się do nazw poszczególnych prowadnic, odpowiednio: dolna, środkowa, górna.

Nr	\mathbf{D} (m)	\mathbf{P} (m) \mathbf{P} (m) \mathbf{I}		\mathbf{I} (m/s)	$O(m^3/h)$
symulacji	\mathbf{K}_{d} (III)	K _ś (III)	K g(III)	U_0 (III/S)	Q (m /n)
1	0,015	0,015	0,015	0,3	54
2	0,005	0,015	0,015	0,3	54
3	0,01	0,015	0,015	0,3	54
4	0,01	0,01	0,015	0,3	54
5	0,01	0,01	0,015	1,6	288

4. Domena obliczeniowa i model numeryczny

Przedstawioną powyżej geometrię, siatkę numeryczną oraz symulacje wykonano w programie COMSOL Multiphysics®. Siatka numeryczna zawiera 207 tyś. czworościennych elementów.

Fig. 3. Siatka numeryczna a) widok na domenę obliczeniową b) zbliżenie na otwory prowadnicy powietrza (zasłaniające elementy płaszcza ukryto)

Symulacje numeryczne wykonano wykorzystując model przepływu laminarnego nieściśliwego powietrza. Przeprowadzono badania przepływu stacjonarnego. Na wlocie do domeny zadano warunek brzegowy prędkości U_0 , zaś na wylocie z domeny ustanowiono warunek brzegowy ciśnienia. Na pozostałych ściankach ustanowiono warunek braku poślizgu na ściance. Do rozwiązania układu równań różniczkowych wybrano solver MUMPS.

5. Wyniki

W przypadku zastosowania takich samych wymiarów otworów w każdej z prowadnic, powietrze poruszało się przez otwory prowadnicy dolnej (Fig 4a – widoczne wysokie wartości prędkości tuż za otworami) i niewielka ilość powietrza docierała do kolejnych prowadnic (Fig 4a - niskie wartości prędkości za otworami prowadnicy środkowej, Fig 4b – prędkość za otworami prowadnicy górnej bliska zeru). W prezentowanej geometrii zauważalne jest zróżnicowane pole prędkości w bocznych częściach płaszcza oraz brak przepływu w części ponad komorą przędną.

Fig 4. Pole prędkości powietrza w płaszczu chłodzącym komorę dla przypadku pierwszego. a) pole prędkości w płaszczyźnie XZ, b) pole prędkości w płaszczyźnie XY.

Zmiana wymiaru otworów jedynie w dolnej prowadnicy powietrza w symulacji nr 2 (trzykrotne zmieszenie wymiaru otworu), spowodowała zwiększony przepływ przez otwory prowadnicy środkowej (Fig 5a) i górnej (Fig 5b) w porównaniu do symulacji nr 1. Jednocześnie otrzymano równomierne pole prędkości w bocznej części płaszcza chłodzącego. W przypadku górnej części płaszcza zauważalny jest wzrost prędkości za otworami prowadnicy, zwężający się ku wylotowi z płaszcza.

Fig 5. Pole prędkości powietrza w płaszczu chłodzącym komorę dla przypadku drugiego. a) pole prędkości w płaszczyźnie XZ, b) pole prędkości w płaszczyźnie XY.

Zmiana wymiaru otworów jedynie w dolnej prowadnicy powietrza w symulacji nr 3 (dwukrotne zmieszenie wymiaru otworu), spowodowała zwiększony przepływ przez otwory prowadnicy środkowej (Fig 6a) i górnej (Fig 6b) w porównaniu do symulacji nr 1. Jednocześnie otrzymano równomierne pole prędkości w bocznej i górnej części płaszcza.

Fig 6. Pole prędkości powietrza w płaszczu chłodzącym komorę dla przypadku trzeciego. a) pole prędkości w płaszczyźnie XZ, b) pole prędkości w płaszczyźnie XY.

Jednoczesne zmniejszenie wymiaru otworów w prowadnicy dolnej i środkowej w symulacji nr 4, spowodowało znacznie zwiększenie przepływu w górnej części płaszcza (Fig 6b - wzrost wartości prędkości). Uzyskano mniej jednorodne pole prędkości w bocznej części płaszcza.

Fig 7. Pole prędkości powietrza w płaszczu chłodzącym komorę dla przypadku czwartego. a) pole prędkości w płaszczyźnie XZ, b) pole prędkości w płaszczyźnie XY.

Pięciokrotne zwiększenie przepływu przez układ (symulacje nr 5) spowodowało znaczny wzrost prędkości w kanałach rozprowadzających powietrze. Zwiększony został również przepływ w górnej części komory.

Fig 8. Pole prędkości powietrza w płaszczu chłodzącym komorę dla przypadku piątego. a) pole prędkości w płaszczyźnie XZ, b) pole prędkości w płaszczyźnie XY.

6. Podsumowanie

Z przeprowadzonych symulacji wybrano geometrię z otworami o promieniu 0,01 m w prowadnicach dolnej i środkowej oraz 0,015 w górnej.

Tab. 2. Promienie zastosowanych otworów w poszczególnych prowadnicach oraz wartość przepływu w układzie.

Nr symulacji	R _d (m)	$\mathbf{R}_{\mathbf{\hat{s}}}\left(\mathbf{m} ight)$	R _g (m)	U ₀ (m/s)	Q (m ³ /h)
4	0,01	0,01	0,015	0,3	54
5	0,01	0,01	0,015	1,6	288

Takie rozwiązanie zapewni odpowiednie chłodzenie ścianek bocznych oraz górnej ścianki części przędnej pod którą znajduje się dysza.

Spis załączników:

- Kowalczyk T., "Elektroprzędzenie nanowłókien. Badania podstawowe i zastosowania biomedyczne", IPPT Reports on Fundamental Technological Research, 5/2013, Instytut Podstawowych Problemów Techniki Polska Akademia Nauk, , ISBN 978-83-89687-85-2 (w przygotowaniu)
- 2. Nakielski P., "Systemy uwalniania leków oparte na nanowłoknach polimerowych", Praca doktorska (w przygotowaniu)
- 3. Sulejczak D., Andrychowski J., Kowalczyk T., Nakielski P., Frontczak-Baniewicz M., Kowalewski T.A. "Electrospun nanofiber mat as a protector against the consequences of brain injury" Folia Neuropatol (przyjęty do druku)
- 4. Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., "Modeling drug release from materials based on electrospun nanofibers", COMSOL Conference Rotterdam 2013
- 5. Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., "Drug delivery system based on polimer nanofibers", Reports on Fundamental Technological Research, 4c, 2013
- 6. Nakielski P., "Symulacje numeryczne procesu desorpcji i dyfuzji leku w materiale z nanowłókien" Modelowanie Inżynierskie (po pozytywnej recenzji)
- 7. Nakielski P., Kowalczyk T., Zembrzycki K., Kowalewski T. A. "Evolution of model drug release from nanofibers", IEEE Trans Biomed Eng (wysłany do recenzji)
- Kowalczyk T., Nakielski P., Chmielewski T., Andrychowski J., Frontczak-Baniewicz M., Sulejczak D., Kowalewski T.A, "Zastosowanie nanowłókien w medycynie, Konferencja z okazji 60-lecia PAN, Powsin, 24 May 2012
- Kowalczyk T., Gołąbek-Sulejczak D., Frontczak-Baniewicz M., Grieb P., Kowalewski T.A., "Electrospun nanofibrous nets as potential materials for neurology. Molecular Basis of Pathology and Therapy in Neurological Disorders - The 10th International Symposium, Warsaw, November 25-26, 2010, Acta Neurobiol Exp, 71, SIII-P15, 2011
- Kowalczyk T., Kowalewski T.A., "The Research on Application of Electrospun Nanofibrous Mats as Active Wound Dressing for Prevention of Post-Accidental Damage in the Therapy of the Traumatic Brain Injury (TBI)", Managing Innovation, Warsaw, 22-24 September 2010
- Kowalczyk T., Nakielski P., Kowalewski T.A. Application of nanofibers as Drug Delivery Systems. Book of Abstracts, III National Conference of Nano and Micromechanics 4-6 July 2012, Warsaw 39-40
- Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A. Experimental study of drug release system based on electrospun nanofibers. Book of Abstracts, III National Conference of Nano and Micromechanics 4-6 July 2012, Warsaw 149-150

- Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., Experimental study of drug release system based on electrospun nanofibers. Proceedings of the 23rd International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, Eds:Y. Bai, J. Wang, D. Fang, Beijing, 19-24 August CD-ROM FS10-007, 2012
- Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., Nanofibrous mats as a protective materials in neurosurgery, Nano and Advanced Materials Workshop and Fair, Warsaw, 18-19 September 2013
- Kowalewski T.A., Kowalczyk T., Nakielski P., Frontczak-Baniewicz M., Sulejczak D., Andrychowski J., Application of Nanofibres for Biomedical Diagnostics and Therapy, Swiss Soft Days 12, Bern, 14 October 2013
- Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., Experimental analysis of drug release process from nanofibrous mats, Experiments In Fluid Mechanics Symposium, Warsaw, 14-15 October 2013
- Nakielski P., Kowalczyk T., Kowalewski T.A., Modeling drug release from materials based on electrospun nanofibers, COMSOL Conference Rotterdam 2013, 23-25 October 2013
- Kowalczyk T., Nakielski P., Frontczak-Baniewicz M., Sulejczak D., Andrychowski J., Adamowicz J., Drewa T., Kowalewski T.A., Electrospun nanofibers applied for tissue engineering and medical therapies, Institute of Physics; Electrospinning, Pronciples, Possibilities and Practise, Londyn, 5-6 December 2013
- Kowalewski T.A., Nanowłókna polimerowe w zastosowaniach biomedycznych, Sympozjum "Od czego zacząć? – droga do badań stosowanych" IBD PAN, Warsaw, 21 December 2012
- 20. Zgłoszenie patentowe "Zastosowanie opatrunków z nanowłókien polimerowych w zapobieganiu pourazowym zmianom w mózgu". Zgłoszenie nr P.404667

Projekt NCBiR Nr. R13008110

Zastosowanie elektroprzędzonych nanowłókien jako opatrunków aktywnych w zapobieganiu pourazowym zmianom w tkance mózgowej

Instytut Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk (IPPT PAN)

Informacja dla przedsiębiorców

Przedstawienie produktu

Efektem projektu jest wyrób medyczny, nanoopatrunek neuroprotekcyjny, na bazie membran wytwarzanych z nanowłókien polimerowych. Może on być zastosowany jako śródoperacyjny opatrunek wewnętrzny podczas operacji neurochirurgicznych lub innych podczas których wykonywana jest kraniotomia. Celem opatrunku jest ochrona centralnego układu nerwowego (kory mózgowej) przed neurodegeneracją. Zbudowany z nanowłókien materiał ma możliwość uwalniania leków: alfa-tokoferolu, czynnika wzrostu neuronów (NGF) lub neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BNDF). Materiał uwalnia leki w czasie 10-21 dni po czym w czasie 60-180 dni ulega wchłonięciu. Zarówno membrana z nanomateriału jak i wydzielane przez nią leki chroniły tkankę mózgową przed neurodegeneracją w zbadanym czasie do 60 dni, co wykazano na modelu zwierzęcym – szczur. Produkcja membrany jest przedmiotem zgłoszenia patentowego do UPRP.

Potencjalny rynek dla produktu (oszacowanie wartości rynkowej).

W Polsce wykonuje się rocznie ok. 35 tys. operacji neurochirurgicznych w wyniku których może dochodzić do nieprawidłowego procesu gojenia, co skutkuje neurodegeneracją. W 2013 roku wydatki na ochronę zdrowia w Polsce wyniosły 63 mld zł. i wykazały 4% wzrost w stosunku do roku 2012. Szacunkowy rozmiar rynku dla Polski to ok. 10 tys. operacji neurochirurgicznych z użyciem produktu. Wartość membrany jest szacowana na 1 200 zł, co daje rozmiar rynku ok. 12 mln zł rocznie (w Polsce).

W USA szacunkowo wykonuje się ok. 250 tys. kraniotomii rocznie, drugie tyle operacji wykonuje się w UE. Przy założeniu użycia materiału w co drugiej operacji, przy przewadze jakościowej wobec stosowanych obecnie rozwiązań, które chronią jedynie oponę twardą, a nie chronią tkanki mózgowej wielkość rynku wynosi od. ok. 450 mln zł (USA i UE) do ok. 1 500 mln zł (cały świat). Dodatkowo potencjał rynkowy produktu jako systemu uwalniania leku szacowany jest na 3-6 mld zł. Produkt posiada wysoką wartość dodaną reprezentowaną przez nanotechnologię, w związku z czym daje możliwość osiągania wysokiej stopy zysków w czasie życia na rynku tj. ok. 10 lat.

Stan rozwoju technologii.

Produkt przeszedł pozytywne badania niekliniczne i może być dalej komercjalizowany do faz A i B badań klinicznych we współpracy z centrami transferu technologii współudziałowców praw do patentu:

- Instytutu Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk (IPPT PAN),
- Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk (IMDiK PAN),
- Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM).