

Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych
Polskiej Akademii Nauk



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Jakub Włodarczyk

**Elektroprzędzone dwustrumieniowo poliestrowo-
poliuretanowe włókniny do zastosowań w leczeniu
przepuklin**

**Dual-jet electrospun polyester-polyurethane
nonwovens for the treatment of hernias**

Promotor: prof. dr hab. inż. Janusz Kasperczyk

Promotor pomocniczy: dr Michał Sobota

Zabrze 2023

Podziękowania

Serdecznie dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej, w szczególności Profesorowi Januszowi Kasperczykowi oraz dr Michałowi Sobocie za cenne uwagi, konsultacje oraz opiekę promotorską. Dziękuję również wszystkim kolegom i koleżankom z CMPW PAN, którzy okazali mi pomoc w realizacji prac badawczych oraz mojej rodzinie i przyjaciołom, za okazane wsparcie.

Spis treści

Spis Rysunków	6
Summary	12
1. Wstęp	18
2. Siatki chirurgiczne, jako implanty wykorzystywane w leczeniu przepuklin	19
2.1. Właściwości mechaniczne tkanek miękkich	24
3. Biomateriały polimerowe	26
3.1. Charakterystyka poliestrów biodegradowalnych	27
3.1.1. Polilaktyd	29
3.1.2. Poliglikolid	30
3.1.3. Poli(laktyd-co-glikolid)	30
3.1.4. Poli(ϵ -kaprolakton)	31
3.1.5. Poli(ϵ -kaprolakton-co-węglan trimetyleny)	32
3.2. Poliuretany, jako biostabilne biomateriały nieulegające biodegradacji	32
4. Systemy kontrolowanego uwalniania leków	34
4.1. Charakterystyka ogólna procesu uwalniania leków	35
4.2. Polimerowe systemy uwalniania leków	37
4.3. Uwalnianie leków z polimerowych matryc	38
4.3.1. Parametry leku	38
4.3.2. Parametry matrycy polimerowej	39
4.3.3. Parametry formulacji polimerowego systemu uwalniania leków	40
4.4. Charakterystyka procesów rządzących kinetyką uwalniania leków	40
4.4.1. Rozpuszczanie i dyfuzja	40
4.4.2. Teorie rozpuszczania	43
4.4.3. Osmoza i pęcznienie matrycy	45
4.5. Przebieg profili uwalniania leków z polimerowych systemów	46
4.6. Modele matematyczne uwalniania leków	48
4.6.1. Model kinetyki uwalniania zerowego rzędu	49
4.6.2. Model kinetyki uwalniania pierwszego rzędu	50
4.6.3. Model Higuchiego	50
4.6.4. Model Hixona-Corwella	51
4.6.5. Model Korsmeyera-Peppasa	52
4.6.6. Model Gallaghery-Corrigana	53
4.6.7. Model Hopfenberga	54
4.6.8. Pozostałe modele i sposoby analizy kinetyki uwalniania leków	54
5. Degradacja polimerów biodegradowalnych	56
5.1. Degradacja hydrolityczna poliestrów biodegradowalnych	57
5.2. Zjawisko erozji podczas degradacji hydrolitycznej poliestrów biodegradowalnych	58
6. Charakterystyka procesu elektroprzędzenia	60
6.1. Degradacja hydrolityczna nanowłóknin otrzymanych metodą elektroprzędzenia	66

6.2. Uwalnianie leków z nanowłóknin otrzymanych metodą elektroprzędzenia	68
8. Hipoteza badawcza oraz cel pracy	71
9. Zakres pracy	72
10. Materiały wykorzystane w badaniach.....	73
11. Metody badawcze oraz wykorzystana aparatura.....	74
11.1. Procedura otrzymywania włóknin metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia	74
11.2. Procedura inkubacji włóknin.....	75
11.3. Analiza morfologii powierzchni włóknin z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz mikroskopii optycznej.....	76
11.4. Wyznaczanie średnich mas molowych metodą chromatografii wykluczania (SEC/GPC)	76
11.5. Badanie właściwości termicznych metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC)	76
11.6. Analiza składu molowego oraz mikrostruktury kopoliestrów za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	77
11.7. Wyznaczanie profili uwalniania leków za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej...77	
11.8. Modelowanie matematyczne kinetyki uwalniania leków	78
11.9. Wyznaczanie kąta zwilżania	78
11.10. Wyznaczanie właściwości mechanicznych w statycznej próbie rozciągania	79
11.11. Badania cytotoksyczności oraz adhezji in vitro na fibroblastach	79
11.12. Badanie przenikania roztworu modelowego barwnika przez włókniny	79
12. Charakterystyka wykorzystanych polimerów i leków	81
12.1. Poli(D,L-laktyd-co-glikolid) (PDLGA).....	81
12.2. Poli(ε-kaprolakton-co-węglan trimetyleny) (PCLTMC)	82
12.3. Poli(ε-kaprolakton) (PCL)	85
12.4. Poli(węglano uretany) (PCU)	85
12.5. Leki.....	86
13. Otrzymywanie włóknin metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia.....	88
13.1. Otrzymywanie włóknin PDLGA/PCU.....	88
13.2. Otrzymywanie włóknin PCLTMC:PCL/PCU	90
14. Wpływ inkubacji w wodnym roztworze PBS na właściwości PCU	93
15. Badanie włóknin PDLGA/PCU	96
15.1. Eksperyment 1 - badanie włóknin PDLGA otrzymanych z roztworów w HFIP, zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien ChronoSil oraz HydroThane.....	96
15.1.1. Analiza zmian morfologii powierzchni włóknin	96
15.1.2. Pomiar absorpcji wody przez włókniny PDLGA/PCU.....	105
15.1.3. Badanie szybkości erozji na podstawie pomiarów ubytku wagowego frakcji PDLGA	108
15.1.4. Badanie zmian średnich mas molowych oraz dyspersyjności PDLGA podczas degradacji ...	110
15.1.5. Badanie zmian składu molowego PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej	113
15.1.6. Analiza zmian właściwości termicznych PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej	116
15.1.7. Wyznaczanie profili uwalniania leków	120
15.1.8. Analiza zmian właściwości mechanicznych włóknin PDLGA/PCU w czasie inkubacji	127

15.1.9. Badanie włókniń PDLGA/PCU z wykorzystaniem linii komórkowej fibroblastów	133
15.2. Eksperyment 2 – badanie włókniń PDLGA otrzymanych z roztworów w DCM, zmodyfikowanych za pomocą nanowłókniń ChronoSil, HydroThane oraz ChronoFlex	136
15.2.1. Analiza zmian morfologii powierzchni włókniń	136
15.2.2. Pomiar absorpcji wody przez włókniń PDLGA/PCU	144
15.2.3. Badanie szybkości erozji na podstawie ubytku wagowego frakcji PDLGA	147
15.2.4. Badanie zmian średnich mas molowych oraz dyspersyjności PDLGA podczas degradacji hydrolitycznej	149
15.2.5. Badanie zmian składu molowego PDLGA w czasie degradacji hydrolitycznej	152
15.2.6. Analiza zmian właściwości termicznych PDLGA w czasie degradacji hydrolitycznej	154
15.2.7. Wyznaczanie profili uwalniania leków	157
15.2.8. Analiza zmian właściwości mechanicznych włókniń PDLGA/PCU w czasie inkubacji	163
15.2.9. Badanie przenikania barwnika przez wewnętrzną membranę PCU włókniń	167
15.2.10. Badania włókniń PDLGA/PCU z wykorzystaniem linii komórkowej	169
16. Badanie właściwości włókniń PCLTMC:PCL/PCU	172
16.1. Eksperyment 3 – badanie włókniń PCLTMC:PCL, zmodyfikowanych za pomocą nanowłókniń ChronoSil, HydroThane oraz ChronoFlex	172
16.1.1. Analiza zmian morfologii powierzchni włókniń	172
16.1.2. Pomiar absorpcji wody przez włókniń PCLTMC:PCL/PCU	176
16.1.3. Badanie szybkości erozji na podstawie pomiarów ubytku wagowego PCLTMC:PCL	178
16.1.4. Badanie zmian średnich mas molowych oraz dyspersyjności PCLTMC:PCL podczas degradacji hydrolitycznej	180
16.1.5. Badanie zmian składu molowego PCLTMC:PCL w czasie degradacji hydrolitycznej	183
16.1.6. Analiza zmian właściwości termicznych PCLTMC:PCL w czasie degradacji włókniń	184
16.1.7. Wyznaczanie profili uwalniania leków	186
16.1.8. Analiza zmian właściwości mechanicznych włókniń PCLTMC:PCL/PCU w czasie degradacji hydrolitycznej	192
16.1.9. Badanie przenikania barwnika przez wewnętrzną membranę PCU włókniń	196
16.1.10. Badania włókniń PCLTMC:PCL/PCU z wykorzystaniem linii komórkowej	199
17. Podsumowanie	201
18. Wnioski	206
Literatura	211

Spis Rysunków

Rys. 1. Schematyczne przedstawienie przepukliny brzusznej.....	19
Rys. 2. Mechanizmy reakcji hydrolizy wiązania estrowego katalizowanej zasadowo oraz kwasowo ...	29
Rys. 3. Koncepcyjne przedstawienie zmian stężenia leku w osoczu odpowiadające kontrolowanemu oraz pulsacyjnemu uwalnianiu	36
Rys. 4. Schematyczne przedstawienie procesu rozpuszczania	41
Rys. 5. Schemat modelu warstwy dyfuzyjnej rozpuszczania ciała stałego.....	44
Rys. 6. Schemat modelu bariery międzyfazowej rozpuszczania ciała stałego	44
Rys. 7. Schemat modelu Danckwerta rozpuszczania ciała stałego.....	45
Rys. 8. Podstawowe typy profili uwalniania leków z polimerowych biodegradowalnych matryc	47
Rys. 9. Profil uwalniania leku charakterystyczny dla modelu Gallaghery-Corrigana.....	53
Rys. 10. Schemat mechanizmu erozji powierzchniowej (heterogenicznej) i w masie (homogenicznej)	59
Rys. 11. Przykłady otrzymywanych struktur w zależności od lepkości roztworu polimerowego podczas elektroprzędzenia: folia otrzymana poprzez połączenie się ze sobą cząstek elektrospreju (A), tzw. „koraliki” (B), nanowłókna (C) oraz mikrowstążki (D).....	63
Rys. 12. Zmiany kształtu kropli cieczy znajdującej się na końcu kapilary pod wpływem wartości zastosowanego potencjału prądu elektrycznego, oraz siły działające na stożek Taylora	65
Rys. 13. Schemat przedstawiający rozwój niestabilności strugi elektroprzędzonego roztworu	66
Rys. 14. Zależność szybkości degradacji hydrolitycznej od stosunku powierzchni do objętości (P:V) materiału polimerowego, zachodzącej według mechanizmu erozji powierzchniowej (z lewej) i erozji w masie (z prawej)	68
Rys. 15. Schemat przedstawiający tok przeprowadzonych badań	72
Rys. 16. Schemat aparatury do prowadzenia procesu podwójnego elektroprzędzenia	74
Rys. 17. Schematyczne przedstawienie struktury przekroju włókny oraz koncepcji jej działania.....	75
Rys. 18. Zdjęcie przedstawiające naczynie wraz ze sposobem umieszczenia w nim próbek (A) oraz schemat przedstawiający zasadę pomiaru (B)	80
Rys. 19. Schematyczne przedstawienie reakcji kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia D,L-laktydu i glikolidu	81
Rys. 20. Widmo protonowe ^1H NMR (600 MHz) kopoliestru PDLGA wykonane w DMSO-D ₆	82
Rys. 21. Widmo węglowe ^{13}C NMR (150 MHz) kopoliestru PDLGA wykonane w DMSO-D ₆	82
Rys. 22. Schematyczne przedstawienie reakcji kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia ϵ -kapolaktanu i węglanu trimetyleny.....	83
Rys. 23. Widmo protonowe ^1H NMR (600 MHz) kopoliestru PCLTMC o składnie molowym 40:60% mol jednostek ϵ -kaproilowych do węglanowych wykonane w deuterowanym chloroformie	84
Rys. 24. Widmo węglowe ^{13}C NMR (150 MHz) kopoliestru PCLTMC o składnie molowym 40:60% mol jednostek ϵ -kaproilowych do węglanowych wykonane w deuterowanym chloroformie	84
Rys. 25. Przykładowe krzywe zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ) poliuretanów w postaci pasków folii o wymiarach 10 x 60 mm i grubości 598 ± 82 μm , wyznaczone w statycznej próbie rozciągania	86
Rys. 26. Struktura chemiczna sirolimusu (rapamycyny)	86

Rys. 27. Struktura chemiczna soli sodowej diklofenaku	87
Rys. 28. Porównanie właściwości termicznych oraz morfologii powierzchni włókien otrzymanych z PCLTMC (A), PCL (B) oraz mieszaniny PCLTMC:PCL 90:10 (C); strzałkami zaznaczono endotermie topnienia fazy krystalicznej PCL	91
Rys. 29. Zmiany przebiegu przykładowych krzywych zależności naprężenia od odkształcenia, zmierzone w statycznej próbie rozciągania włókien PCU inkubowanych przez 84 dni w 37 °C	93
Rys. 30. Topnienie fazy krystalicznej we włókninie ChronoFlex (pierwszy bieg DSC, 20 °C/min).....	95
Rys. 31. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU bez leków	98
Rys. 32. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 5% DiNa	100
Rys. 33. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 5% SLM	101
Rys. 34. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 10% DiNa	103
Rys. 35. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 10% SLM	104
Rys. 36. Ilość wody zaabsorbowanej przez włókieniny PDLGA/PCU bez leków ($x \pm SD$; N=3)	106
Rys. 37. Ilość wody zaabsorbowanej przez włókieniny PDLGA/PCU zawierające po 5% (z lewej) oraz po 10% leków (z prawej) ($x \pm SD$; N=3)	107
Rys. 38. Średni ubytek wagi PDLGA (Δm PDLGA) podczas erozji włókien bez leków ($x \pm SD$; N=3)..	109
Rys. 39. Średni ubytek wagi matrycy PDLGA (Δm PDLGA) podczas uwalniania leków i erozji włókien zawierających po 5% (z lewej) i po 10% (z prawej) DiNa i SLM ($x \pm SD$; N=3).....	109
Rys. 40. Zmiany liczbowo średniej masy molowej (M_n) oraz wagowo średniej masy molowej (M_w) PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej ($x \pm SD$; N=3).....	111
Rys. 41. Zmiany dyspersyjności PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej ($x \pm SD$; N=3).....	111
Rys. 42. Zdjęcie mikroskopowe (x10) wnęki powstałej na skutek erozji w masie, na przykładzie włókniny PDLGA/0/H, po 84 dniach degradacji hydrolytycznej. Na zdjęciu A przedstawiono próbkę przed przecięciem, a na B po przecięciu	113
Rys. 43. Termogram DSC przedstawiający zakres przejścia szklanego PDLGA we włókninie PDLGA/Sil/0/H po 168 dniach	118
Rys. 44. Skumulowane uwalnianie sirolimusu z włókien PDLGA/PCU. Początkowe stężenie leku w nośniku wynosiło 5% (z lewej) i 10% (z prawej). Mikrowłókna matrycy otrzymano z roztworów w HFIP ($x \pm SD$; N=3).....	122
Rys. 45. Skumulowane uwalnianie soli sodowej diklofenaku z włókien PDLGA/PCU. Początkowe stężenie leku wynosiło 5% (z lewej) i 10% (z prawej), Mikrowłókna matrycy otrzymano z roztworów w HFIP ($x \pm SD$; N=3)	125
Rys. 46. Przykładowe krzywe zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ), wyznaczone w statycznej próbie rozciągania poliuretanów w postaci prasowanych folii (F) oraz elektroprzędzonych włókien (W).....	127

Rys. 47. Rozmiary krążków włókniny PDLGA/0/H przed degradacją (A) oraz po 84 dniach degradacji (B). Zdjęcia obrazujące kurczenie się materiału niezmodyfikowanego nanowłóknami PCU.....	128
Rys. 48. Przykładowe krzywe rozciągania włókien PDLGA zawierających leki (z lewej) oraz zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien PCU włókien dwukomponentowych, niezawierających substancji aktywnych (z prawej).....	128
Rys. 49. Obrazy przedstawiające uszkodzenia zewnętrznych warstw włókniny otrzymanej metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia na skutek rozciągania próbki PDLGA/Sil/0/H po 84 dniach inkubacji	129
Rys. 50. Przykładowe krzywe zależności naprężenia od odkształcenia obrazujące przebieg zmian właściwości mechanicznych w czasie inkubacji włókien.....	131
Rys. 51. Przeżywalność komórek wyznaczona w materiałach wyjściowych (z lewej) oraz we włókninach zawierających po 5% SLM oraz DiNa (z prawej) ($x \pm SD$; N=4)	134
Rys. 52. Adhezja fibroblastów na powierzchni włókien zawierających sirolimus (pola pełne) oraz sól sodową diklofenaku (pola kreskowane) ($x \pm SD$; N=4)	135
Rys. 53. Obraz SEM (x10 000) pokazujący porowatość powierzchni włókna PDLGA otrzymanego w procesie elektroprzędzenia z roztworu w DCM.....	138
Rys. 54. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU niezawierających leków	139
Rys. 55. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 5% DiNa	141
Rys. 56. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 5% SLM	142
Rys. 57. Średnia ilość zaabsorbowanej wody przez włókniny bez leków (z lewej) oraz zawierające po 5% wag. DiNa i SLM (z prawej) ($x \pm SD$; N=3).....	144
Rys. 58. Obrazy SEM (x500) porównujące wielkość przestrzeni pomiędzy włóknami PDLGA.....	144
Rys. 59. Średni ubytek wagi matrycy PDLGA (Δm PDLGA) podczas degradacji hydrolytycznej i erozji włókien bez leków (z lewej) oraz zawierających po 5% SLM i DiNa (z prawej) ($x \pm SD$; N=3).....	148
Rys. 60. Zmiany liczbowo średniej masy molowej (M_n) oraz wagowo średniej masy molowej (M_w) PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej ($x \pm SD$; N=3).....	150
Rys. 61. Zmiany dyspersyjności PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej ($x \pm SD$; N=3).....	150
Rys. 62. Pierwszy i drugi przebieg pomiaru DSC włókniny PDLGA/Flex/0/D przed degradacją.....	157
Rys. 63. Skumulowane uwalnianie sirolimusu z włókien PDLGA/PCU. Początkowe stężenie leku w nośniku wynosiło 5% wag. Mikrowłókna matrycy otrzymano z roztworów w DCM ($x \pm SD$; N=3).....	158
Rys. 64. Skumulowane uwalnianie soli sodowej diklofenaku z włókien PDLGA/PCU o początkowym stężeniu leku w matrycy wynoszącym 5%. Mikrowłókna matrycy otrzymano z roztworów w DCM ($x \pm SD$; N=3).....	161
Rys. 65. Przykładowe krzywe zależności naprężenia od odkształcenia obrazujące przebieg zmian właściwości mechanicznych w czasie inkubacji włókien.....	165
Rys. 66. Zależność stężenia roztworu BPB w komorze pomiarowej od czasu ($x \pm SD$; N=2).....	168

Rys. 67. Przykładowe zdjęcie włókniń, wykonane po 42 dniach inkubacji w kontakcie z roztworem barwnika BPB.....	169
Rys. 68. Przeżywalność komórek wyznaczona w materiałach wyjściowych (z lewej) oraz we włókniach zawierających po 5% SLM oraz DiNa (z prawej) ($x \pm SD$; N=4)	170
Rys. 69. Adhezja fibroblastów na powierzchni włókniń zawierających sirolimus (pola pełne) oraz sól sodową diklofenaku (pola kreskowane) ($x \pm SD$; N=4)	171
Rys. 70. Obrazy SEM (x2500) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolitycznej włókniń PCLTMC:PCL/PCU bez leków	173
Rys. 71. Obrazy SEM (x2500) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolitycznej włókniń PCLTMC:PCL/PCU zawierających 5% DiNa	174
Rys. 72. Obrazy SEM (x2500) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolitycznej włókniń PCLTMC:PCL/PCU zawierających 5% SLM	175
Rys. 73. Ilość zaabsorbowanej wody przez włókniń PCLTMC:PCL/PCU bez leków (z lewej) oraz zawierające po 5% DiNa i SLM (z prawej) ($x \pm SD$; N=3)	177
Rys. 74. Średni ubytek wagi matrycy PCLTMC:PCL (Δm PCLTMC:PCL) podczas erozji włókniń bez leków (z lewej) oraz zawierających po 5% SLM oraz DiNa (z prawej) ($x \pm SD$; N=3)	179
Rys. 75. Zmiany liczbowo średniej masy molowej (M_n) (po lewej) oraz wagowo średniej masy molowej (M_w) (po prawej) PCLTMC:PCL w czasie degradacji hydrolitycznej ($x \pm SD$; N=3).....	181
Rys. 76. Zmiany dyspersyjności PCLTMC:PCL w czasie degradacji hydrolitycznej ($x \pm SD$; N=3)	181
Rys. 77. Krzywe termiczne DSC przedstawiające wpływ wprowadzenia 10% wag. PCL do kopolimeru PCLTMC na temperaturę zeszklenia oraz krystaliczność otrzymanej mieszaniny.....	185
Rys. 78. Skumulowane uwalnianie SLM z włókniń PCLTMC:PCL/PCU. Początkowe stężenie leku w nośniku wynosiło 5% wag. PCLTMC:PCL otrzymano z roztworów w DCM ($x \pm SD$; N=3)	187
Rys. 79. Skumulowane uwalnianie DiNa z włókniń PCLTMC:PCL/PCU. Początkowe stężenie leku w nośniku wynosiło 5% wag. PCLTMC:PCL otrzymano z roztworów w DCM ($x \pm SD$; N=3)	190
Rys. 80. Przykładowe krzywe zależności naprężenia od odkształcenia obrazujące przebieg zmian właściwości mechanicznych w czasie inkubacji, wyznaczone w statycznej próbie rozciągania	194
Rys. 81. Zależność stężenia roztworu BPB w komorze pomiarowej od czasu ($x \pm SD$; N=2).....	197
Rys. 82. Przykładowe zdjęcie włókniń, wykonane po 42 dniach inkubacji w kontakcie z roztworem barwnika BPB.....	198
Rys. 83. Przeżywalność komórek wyznaczona w materiałach wyjściowych (z lewej) oraz we włókniach zawierających po 5% wag. SLM oraz DiNa (z prawej) ($x \pm SD$; N=3).....	199
Rys. 84. Adhezja fibroblastów na powierzchni włókniń zawierających sirolimus (pola pełne) oraz sól sodową diklofenaku (pola kreskowane) ($x \pm SD$; N=3)	200

Spis Tabel

Tabela 1. Porównanie metod leczenia przepukliny.....	21
Tabela 2. Wytrzymałość mechaniczna przykładowych tkanek miękkich wyznaczona w próbie rozciągania	25
Tabela 3. Podział biomateriałów polimerowych wraz z przykładami	26
Tabela 4. Porównanie podstawowych właściwości fizycznych różnych polimerów laktydu	30
Tabela 5. Zestawienie czynników wpływających na proces uwalniania leków	36
Tabela 6. Mechanizmy uwalniania leku w zależności od wartości obliczonego współczynnika uwalniania (n)	52
Tabela 7. Zestawienie pozostałych modeli i sposobów analizy kinetyki uwalniania leków	55
Tabela 8. Podział parametrów wpływających na morfologię nanowłókien	62
Tabela 9. Sposoby wprowadzania leków do włókien otrzymanych metodą elektroprzędzenia.....	69
Tabela 10. Wykorzystane modele kinetyczne uwalniania leków oraz odpowiadające im funkcje matematyczne	78
Tabela 11. Wybrane właściwości wyjściowe polimerów biodegradowalnych wykorzystanych w badaniach.....	85
Tabela 12. Wybrane właściwości poliuretanów wykorzystanych w badaniach	86
Tabela 13. Wybrane właściwości leków wykorzystanych w badaniach.....	87
Tabela 14. Składy wagowe roztworów oraz parametry procesu elektroprzędzenia i elektrorozpylenia	88
Tabela 15. Zmiany szybkości dozowania V poszczególnych roztworów podczas elektroprzędzenia ...	89
Tabela 16. Składy włókien PDLGA/PCU otrzymanych w Eksperymentcie 1.....	90
Tabela 17. Składy włókien PDLGA/PCU otrzymanych w Eksperymentcie 2.....	90
Tabela 18. Składy wagowe roztworów oraz parametry procesu elektroprzędzenia i elektrorozpylenia	91
Tabela 19. Zmiany szybkości dozowania V poszczególnych roztworów podczas elektroprzędzenia ...	92
Tabela 20. Składy włókien PCLTMC:PCL/PCU otrzymanych w Eksperymentcie 3	92
Tabela 21. Zmiany właściwości mechanicznych włókien PCU w czasie 84 dni inkubacji w roztworze PBS w 37 °C ($\bar{x}\pm SD$; N=3).....	94
Tabela 22. Średnice mikrowłókien PDLGA bez leków, zmierzone podczas inkubacji ($\bar{x}\pm SD$; N=50) ...	98
Tabela 23. Średnice mikrowłókien PDLGA (5% SLM i DiNa), zmierzone podczas inkubacji ($\bar{x}\pm SD$; N=50).....	99
Tabela 24. Średnice mikrowłókien PDLGA (10% SLM i DiNa), zmierzone podczas inkubacji ($\bar{x}\pm SD$; N=50).....	102
Tabela 25. Zmiany składu molowego kopoliestru PDLGA podczas degradacji hydrolitycznej.....	114
Tabela 26. Zmiany wartości Tg PDLGA podczas degradacji hydrolitycznej włókien	117
Tabela 27. Wydajność enkapsulacji leków wyrażona w μg leku przypadającą na 1 mg PDLGA ($\bar{x}\pm SD$; N=5).....	121
Tabela 28. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji przedstawiające dopasowanie modeli kinetyki uwalniania leków do profili uwalniania sirolimusu oraz stałe szybkości uwalniania (k)	123

Tabela 29. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji przedstawiające dopasowanie modeli kinetyki uwalniania leków do profili uwalniania soli sodowej diklofenaku oraz stałe szybkości uwalniania (k)	126
Tabela 30. Zmiany właściwości mechanicznych włókien zmierzone w czasie inkubacji ($x \pm SD$; N=3)	132
Tabela 31. Średnice mikrowłókien PDLGA bez leków, zmierzone podczas inkubacji ($x \pm SD$; N=50) .	137
Tabela 32. Porównanie wpływających na proces elektroprzędzenia właściwości fizycznych dichlorometanu (DCM) oraz hexafluoroizopropanolu (HFIP), na podstawie danych uzyskanych z bazy PubChem	138
Tabela 33. Średnice mikrowłókien PDLGA (5% SLM i DiNa), zmierzone podczas inkubacji ($x \pm SD$; N=50).....	140
Tabela 34. Średnie masy molowe frakcji PDLGA po 168 dniach degradacji ($x \pm SD$; N=2).....	151
Tabela 35. Zmiany składu molowego kopoliestru PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej	153
Tabela 36. Zmiany wartości Tg PDLGA podczas degradacji hydrolytycznej.....	155
Tabela 37. Wydajność enkapsulacji leków wyrażona w μg leku przypadającą na 1 mg PDLGA ($x \pm SD$; N=5).....	158
Tabela 38. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji przedstawiające dopasowanie wybranych modeli kinetyki uwalniania leków do profili uwalniania sirolimusu oraz stałe szybkości uwalniania (k)	160
Tabela 39. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji przedstawiające dopasowanie wybranych modeli kinetyki uwalniania leków do profili uwalniania soli sodowej diklofenaku oraz stałe szybkości uwalniania (k)	162
Tabela 40. Zmiany właściwości mechanicznych włókien zmierzone w czasie inkubacji ($x \pm SD$; N=3)	166
Tabela 41. Zmiany współczynnika retencji (R) włókien, względem BPB w czasie inkubacji, wyznaczone na podstawie średnich stężeń barwnika w nadawie i permeacie	168
Tabela 42. Wpływ PCL na właściwości mieszanki PCLTMC:PCL oraz ich porównanie z PDLGA	172
Tabela 43. Zmiany składu molowego mieszaniny PCLTMC:PCL podczas degradacji hydrolytycznej	183
Tabela 44. Zmiany temperatury zeszklenia PCLTMC:PCL (90:10 % wag.) w czasie degradacji hydrolytycznej.....	184
Tabela 45. Wydajność enkapsulacji leków wyrażona w μg leku przypadającą na 1 mg PCLTMC:PCL ($x \pm SD$; N=5).....	186
Tabela 46. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji przedstawiające dopasowanie wybranych modeli kinetyki uwalniania leków do empirycznych profili uwalniania sirolimusu oraz stałe szybkości uwalniania (k)	188
Tabela 47. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji przedstawiające dopasowanie wybranych modeli kinetyki uwalniania leków do empirycznych profili uwalniania DiNa oraz stałe szybkości uwalniania (k)	191
Tabela 48. Zmiany właściwości mechanicznych włókien zmierzone w czasie inkubacji ($x \pm SD$; N=3)	193
Tabela 49. Zmiany współczynnika retencji (R) włókien, względem BPB w czasie inkubacji, wyznaczone na podstawie średnich stężeń barwnika w nadawie i permeacie	197

Summary

The aim of the thesis was to investigate a new method of controlling the rate of hydrolytic degradation as well as the release rate of active substances from the biodegradable polymer matrix in the form of electrospun nonwovens. The main assumption was to modify the kinetics of drug release without changing the physical and chemical properties of the carrier. Secondary goal was to obtain sufficient mechanical properties during the hydrolytic degradation of nonwovens, allowing to perform the potential function of strengthening damaged soft tissues. The research was conducted in terms of the use of the developed material as a surgical mesh for the treatment of hernias.

Work was carried out in three main stages, during which, the effect of introducing of different poly(carbonate urethane) (PCU) modifiers in the form of nanofibers, on the release rate of sirolimus and diclofenac sodium from biodegradable copolyester microfibers was studied. Three types of commercially available PCUs, differing in hydrophilicity, hygroscopicity, thermal and mechanical properties were selected. Also, two biodegradable copolymers: poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PDLGA) and poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylene carbonate) (PCLTMC) were synthesized, to perform the function of drug carrier. Two-component, partially biodegradable nonwovens were produced via dual-jet electrospinning, consisting in simultaneously processing of the copolyester solution, containing active substances and the PCU solution. In this way, an interlacing of biodegradable drug-releasing microfibers and non-degradable modifier nanofibers was created.

In the first stage, PDLGA/PCU nonwovens were examined. By using copolyester solutions in hexafluoroisopropanol (HFIP), smooth drug-loaded microfibers were obtained. PCU-modifier nanofibers were electrospun from solutions in dimethylacetamide (DMAc). Obtained materials were incubated in an aqueous solution of phosphate-buffered saline (pH 7.4) at 37 °C for 24 weeks. The progress of hydrolytic degradation and erosion was investigated by analytical methods such as nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), size exclusion chromatography (SEC/GPC), differential scanning calorimetry (DSC) and scanning electron microscopy (SEM). The rate of drugs release was measured using high-performance liquid chromatography (HPLC). Based on experimental data, a fitting the obtained results to selected kinetic models were performed. Changes in mechanical properties during the incubation of samples were measured in a static tensile test. Measurements of the permeation rate of a low-molecular, model substance through the internal structure of nonwovens were also carried out. On the basis of the obtained results, the retention coefficients of the developed materials were determined. Using a fibroblast cell line, in vitro cytotoxicity and cell adhesion on the surface of electrospun nonwovens were also assessed. In the second experiment, the effect of increased the porosity and diameters of PDLGA microfibers, obtained using solutions in dichloromethane (DCM) was investigated. PDLGA/PCU nonwovens were tested in the same way as in the first experiment. The third experiment was carried out with the use of a more hydrophobic matrix, which was a blend of PCLTMC copolymer with a small addition of poly(ϵ -caprolactone)(PCL). Homopolymer was a fiber stabilizer, used due to the very low glass transition temperature of PCLTMC and the amorphous structure, which led to immediate fusion of the obtained fibers into a homogeneous mass. The matrix was changed, to show that the modification of a different biodegradable material with PCU nanofibers gives an analogous effect, regardless of the hydrophilicity

and physical properties of the polymer used as the drug carrier. The obtained PCLTMC:PCL/PCU nonwovens were tested in the same way as in two previous experiments.

The introduction of the PCU modifier with a different hydrophilicity than the biodegradable polymer, into the copolyester, electrospun nonwoven resulted in the change in the affinity of the obtained material to water, which is the main component of the biological environment. In this way, a change in the macroscopic hydrophilicity of the nonwoven was obtained, which affected the process of water diffusion to the copolyester microfibers and thus, their hydrolysis and dissolution of the drug. After the introduction of PCU nanofibers, the path and diffusion resistance of active substances and hydrolytic degradation products to the environment also changed, which affected both the obtained release profiles and the physical properties of the matrix. The developed gradient interlacing structure of biodegradable and non-biodegradable components, whose mutual weight ratio changed as a function of the distance from the nonwoven core to its surface, allowed for effective release of active substances while stabilizing the mechanical properties of nonwovens during degradation. This procedure potentially gave the possibility of using the material as implants, i.e. surgical mesh, used in the treatment of hernias. The introduction of a solid polyurethane membrane in the core of the nonwoven, made it possible to inhibit and/or control the diffusion of drugs within the internal structure of the material. Two functional outer surfaces of the nonwoven were developed. Each one released a different drug and was separated from the other by mentioned internal solid PCU membrane. The first one released hardly soluble sirolimus, with antiproliferative properties, the presence of which additionally hydrophobized the copolyester matrix, decreasing the rate of hydrolytic degradation. The assumption of the operation of this surface was to create anti-adhesive properties of the material in relation to cells, which, when used as a surgical mesh, would reduce the probability of formation of adhesions that could be dangerous for the patient. On the other side of the material, the readily soluble diclofenac sodium salt, belonging to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs, was released. This drug, was releasing much faster, accelerating the degradation and carrier erosion, which gave a stronger effect in the case of a more hydrophilic matrix with a glass transition temperature above the incubation temperature. A potential function of diclofenac sodium in terms of its use in the treatment of hernias would be to reduce postoperative pain and lowering the likelihood of inflammation. The functionality of both described surfaces of nonwovens was tested by analysing the kinetics of drugs release and by conducting experiments with the participation of a fibroblasts cell line. During the measurements, it was observed that with the increase in the hydrophobicity of modifiers in the form of PCU nanofibers, the rate of drug release from copolyester microfibers decreases. Changes in the rate and mechanism of hydrolytic degradation were also noted, which was influenced by the modification of the material water uptake. The mechanical and thermal properties of the used poly(carbonate urethanes) had a significant impact on the stabilization of the tensile strength and elasticity of the nonwovens during incubation in the degradation medium. Higher values of nanofibers diameters and a glass transition temperature above the incubation temperature clearly improved the strain and stress characteristics of the materials, looking through the prism of potential use in the function of supporting damaged soft tissues.

As part of the research, thanks to the use of the dual-jet electrospinning, the functionality of the controlled drug release system and the implant in the form of a nanostructured surgical mesh with potential use in the treatment of hernias were combined. By using both biodegradable polymers, acting as a drug carrier, and non-biodegradable PCU modifiers, the advantages of both types of polymers were synergistically combined, while reducing their disadvantages, for use as a surgical implant. The conducted basic research on the kinetics of the release of active substances, the rate of hydrolytic degradation and erosion of copolyesters, changes in the mechanical properties of nonwovens accompanying these processes, the penetration of drugs through the internal structure of obtained materials and its interaction with cells in vitro, allowed to draw many application conclusions, constituting a solid basis for further research on this topic.

Wykaz skrótów

- ANOVA – analiza wariancji (*ang. analysis of variance*)
- BPB – błękit bromofenolowy (*ang. bromophenol blue*)
- CL – ϵ -kaprolakton
- DCM – dichlorometan (chlorek metylenu)
- DiNa – sól sodowa diklofenaku
- DMAc – N,N-dimetyloacetamid
- DMF – N,N-dimetyloformamid
- DSC – różnicowa kalorymetria skaningowa (*ang. differential scanning calorimetry*)
- ECM – macierz pozakomórkowa (*ang. extracellular matrix*)
- ePTFE - ekspandowany poli(tetrafluoroetylen)
- ESB – Europejskie Towarzystwo Biomateriałów (*ang. European Society for Biomaterials*)
- FDA – Agencja Żywności i Leków (*ang. Food and Drug Agency*)
- FET – tranzystor polowy (*ang. field effect transistor*)
- Flex – ChronoFlex AL75D
- GL – glikolid
- GPC/SEC – chromatografia żelowa/wykluczania (*ang. gel permeation/size-exclusion chromatography*)
- HDPE – polietylen wysokiej gęstości
- HFIP - 1,1,1,3,3-hexafluoroizopropanol
- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (*ang. high-performance liquid chromatography*)
- IF – intensywność fluorescencji
- LA – laktyd
- LED – dioda elektroluminescencyjna (*ang. light-emitting diode*)
- NF – Narodowy Recepteriusz (*ang. National Formulary*)
- NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang. Nuclear Magnetic Resonance*)
- ROP – polimeryzacja z otwarciem pierścienia (*ang. ring opening polymerization*)
- P4HB – poli(4-hydroksymaślan)
- PA – poliamid
- PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanem (*ang. phosphate buffered saline*)
- PC – poliwęglan
- PCL – poli(ϵ -kaprolakton)
- PCLTMC – poli(ϵ -kaprolakton-co-węglan trimetylenu)
- PCU – poli(węglano uretan)
- PDLA – poli(D-laktyd)
- PDLGA – poli(D,L-laktyd-co-glikolid)
- PDLLA – poli(D,L-laktyd)
- PDO – polidioksanon
- PEG – poli(glikol etylenowy)
- PET – poli(tereftalan etylenu)
- PGA – poliglikolid

PHA – polihydroksyalkaniany
PLA – polilaktyd
PLDLLA – poli(L-laktyd-co-D,L-laktyd)
PLLA – poli(L-laktyd)
PLGA – poli(laktyd-co-glikolid)
PP – polipropylen
PPF – poli(fumaran propylenu)
PTMC – poli(węglan trimetyleny)
PU – poliuretan
PVA – poli(alkohol winylowy)
SLM – sirolimus (rapamycyna)
Sil – ChronoSil AL80A 5%
Thane – HydroThane AR25 80A
THF – tetrahydrofuran
TPU – termoplastyczny poliuretan
USP – Farmakopea Stanów Zjednoczonych (*ang. United States Pharmacopea*)
UV-VIS – spektrofotometria w zakresie światła widzialnego i ultrafioletu

Część Literaturowa

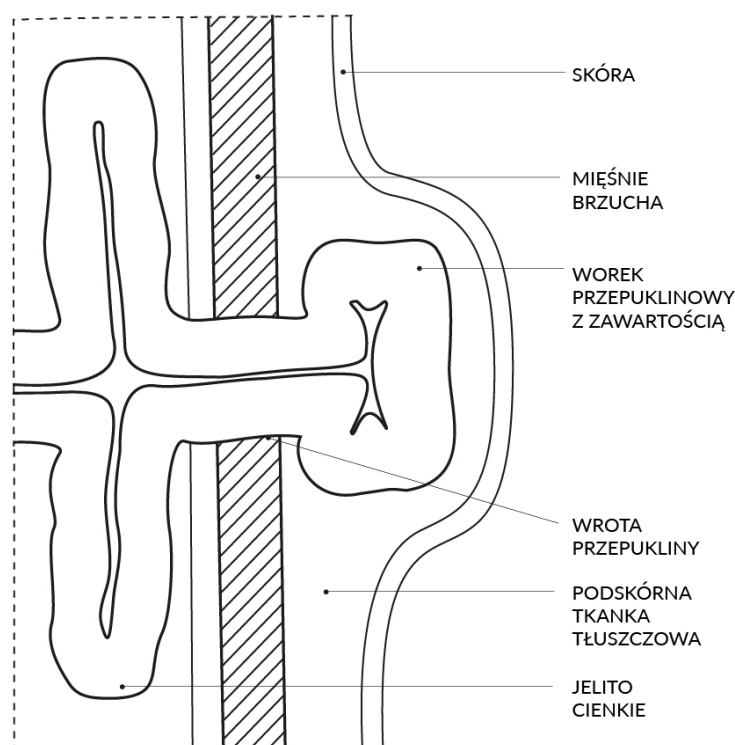
1. Wstęp

Wraz z rozwojem medycyny i biotechnologii oraz postępowaniem w dziedzinie biomateriałów, pojawiła się koncepcja urządzeń, które mogą być umieszczone wewnątrz organizmu na stałe lub przez określony czas. Celem ich działania miało być zastąpienie, wspomaganie, wzmocnienie oraz regeneracja uszkodzonych lub brakujących struktur biologicznych, pełnienie funkcji diagnostycznych lub uwalnianie substancji o działaniu leczniczym do określonych tkanek. Urządzenia tego typu określa się mianem implantów biomedycznych. Przykład stanowią m.in. wszczepy sercowo-naczyniowe (tj. sztuczna zastawka serca, rozruszniki, stenty), implanty strukturalne (protezy biodrowe, kolanowe lub do rekonstrukcji twarzoczaszki), implanty kosmetyczne, szwy i siatki chirurgiczne, implanty kręgosłupa (sztuczne dyski, stabilizatory), implanty okulistyczne, dentystyczne, a także rusztowania komórkowe oraz implantowalne systemy uwalniania leków. W zależności od pełnionych funkcji, implanty różnią się konstrukcją oraz materiałami, z których są wykonane. Należnie do tego czy zostały wytworzone ze stopów metali, ceramiki, materiałów węglowych lub polimerowych, zarówno biodegradowalnych jak i nieulegających biodegradacji, ze względu na bezpośredni kontakt z płynami fizjologicznymi oraz tkankami muszą spełniać warunek biogodności [1,2]. Wprowadzanie implantów do ciała odbywa się na drodze zabiegu chirurgicznego według określonej procedury. Wiąże się to z ryzykiem infekcji a także silnej odpowiedzi organizmu na ciało obce, skutkującej obrzękiem i stanem zapalnym, co może doprowadzić do zaburzeń w procesie gojenia oraz ciężkich powikłań [3]. Z tego względu prowadzone są liczne badania nad implantami uwalniającymi leki, które z jednej strony mają ograniczać potencjalne, negatywne konsekwencje interwencji chirurgicznej, a z drugiej, mogą wspomagać procesy regeneracyjne, co wiąże się z poprawą wygody pacjentów [4]. Na szczególną uwagę zasługują materiały polimerowe, które pomimo mniejszej wytrzymałości mechanicznej niż metale oraz ceramika, znalazły wiele zastosowań w tej dziedzinie. Do ich zalet można zaliczyć łatwość formowania, wiele prostych sposobów na wprowadzenie leku, a także w niektórych przypadkach zdolność do kontrolowanej biodegradacji umożliwiającej bioresorpcję implantu, polegającą na wchłonięciu produktów jego rozkładu przez organizm [5,6].

Według raportów ekspertów Agencji Żywności i Leków FDA (ang. *Food and Drug Administration*) już w 2000 roku 8–10% populacji w USA oraz 5–6% w uprzemysłowionych krajach na całym świecie miało w ciągu swojego życia kontakt z implantem medycznym służącym do przywrócenia pewnych funkcji organizmu, poprawy jakości życia lub jego przedłużenia [7]. Obecne badania wskazują, że wykorzystanie implantów, zwłaszcza uwalniających substancje o działaniu terapeutycznym rośnie. Przewiduje się, że do 2027 r. wielkość rynku tego typu urządzeń medycznych wyniesie 13,2 miliarda USD [8]. Świadczy to o dużym zapotrzebowaniu na implanty biomedyczne i bez wątpienia stanowi katalizator dla podejmowania prac badawczo-rozwojowych w tej dziedzinie przez naukowców na całym świecie.

2. Siatki chirurgiczne, jako implanty wykorzystywane w leczeniu przepuklin

Implant można umieścić w organizmie jedynie podczas przeprowadzenia procedury chirurgicznej. Jednym z najczęściej wykonywanych zabiegów w obrębie jamy brzusznej jest usunięcie przepukliny (łac. *hernia*) [9]. Jest to defekt polegający na wypukleniu zawartości jamy ciała na skutek pęknięcia mięśni i powięzi. Worek przepuklinowy wraz z zawartością najczęściej przedostaje się przez wrota przepukliny, będące miejscem o obniżonej wytrzymałości, pod skórę, tworząc w tym miejscu wyczuwalne owalne wybrzuszenie (Rys. 1). Brak odpowiedniego leczenia skutkuje silnym bólem i może prowadzić do bardzo poważnych powikłań tj. uwięźnięcie jelita, uniemożliwiające przesuwanie się treści pokarmowej i w rezultacie skutkujące jego niedrożnością. Ucisk sprawia, że przepływ krwi w obrębie tkanek jest utrudniony, co może doprowadzić do powstania stanów martwiczych. W ekstremalnych przypadkach może nawet dojść do perforacji jelita, zapalenia otrzewnej, wstrząsu septycznego, a nawet śmierci [10].



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie przepukliny brzusznej

Każdego roku, przepuklina dotyka wiele milionów ludzi na całym świecie. Szacuje się, że mniejszym lub większym stopniu dotyczy 3–4% populacji, biorąc pod uwagę osoby powyżej 45 roku życia [11]. W samych Stanach Zjednoczonych wykonuje się rocznie około 1,4 mln zabiegów usunięcia przepukliny, nie licząc leczenia jej nawrotu, który jest częstym powikłaniem i dotyczy nawet co piątego pacjenta [12]. Siedzący tryb życia oraz otyłość, coraz bardziej stające się problemem cywilizacyjnym, prowadzą do osłabienia neuralgicznych obszarów mięśni i powięzi w obrębie jamy brzusznej oraz pachwiny, co skutkuje zwiększonym ryzykiem ich rozerwania [13].

Przepukliny można sklasyfikować wg kilku kryteriów, jednak ogólnie przyjmuje się, że dzielą się w zależności od ich genezy (wrodzone lub nabyte) oraz miejsca występowania (kryterium anatomiczne) [14]. Pod pojęciem przepukliny wrodzonej postrzega się wszystkie ubytki powstałe na etapie rozwoju płodu, prowadzące do wytworzenia się nieciągłości w obrębie tkanek, która skutkuje przemieszczeniem narządów z ich pierwotnej lokacji. Przepukliny wtórne to wszystkie inne, pojawiające się w ciągu życia na skutek urazów, chorób, czy też zabiegów chirurgicznych. Biorąc pod uwagę anatomiczne kryterium podziału, możemy wyszczególnić przepukliny brzuszne (tj. pępkowa, kresy białej, Spiegela, w nadbrzuszu), rozetne, które są wynikiem powikłań po zabiegach chirurgicznych, rozworu przełykowego, udowe czy też najczęściej występujące – pachwinowe, które stanowią około 65% wszystkich przypadków. Ze względów anatomicznych, a także częstszego wykonywania ciężkich prac fizycznych, przepuklina znacznie częściej pojawia się u mężczyzn. Dane statystyczne świadczą o 7-10 krotnie większej podatności na tego typu uraz niż w przypadku kobiet. U mężczyzn najczęściej występuje przepuklina pachwinowa, zaś w przypadku kobiet jest to przepuklina udowa. Ryzyko rozerwania tkanek wynika przede wszystkim z osłabienia mięśni i powięzi, które może być skutkiem podeszłego wieku, powikłań po wcześniejszych zabiegach chirurgicznych w obrębie jamy brzusznej lub zaburzeń w metabolizmie kolagenu. Dodatkowo, sprzyjającym czynnikiem jest przewlekłe, podwyższone ciśnienie w jamie brzusznej będące rezultatem np. z otyłości, wodobrzusza, przewlekłego kaszlu, czy też obecności guzów nowotworowych [10,15].

Usunięcie przepukliny odbywa się na drodze zabiegu, zaliczającego się do prostych procedur operacyjnych. Wyszczególnić można dwie główne drogi leczenia, różniące się formą zastosowanych materiałów chirurgicznych, za pomocą których łączone są uszkodzone tkanki. Pierwszą jest metoda napięciowa wykorzystująca szwy chirurgiczne, którymi ze względu na ryzyko rozerwania naprężonych tkanek i ponownego powstania defektu w tym samym lub sąsiadującym miejscu zamykane są raczej niewielkie ubytki. Procedura ta jest stosunkowo łatwa w wykonaniu, jednak ze względu na konieczność otwarcia jamy brzusznej, powrót do zdrowia pacjenta jest dłuższy i towarzyszy mu znaczny ból pooperacyjny. Drugim sposobem leczenia przepuklin są metody beznapięciowe, polegające na zaimplantowaniu siatki chirurgicznej, za pomocą której możliwe jest zamykanie dużych ubytków. Zakotwiczenie implantu w pożądanym miejscu uzyskuje się przy użyciu szwów chirurgicznych, specjalnych zszywek lub klejów tkankowych. Procedura wykonywana jest laparoskopowo, przez co zabieg jest bardziej skomplikowany, jednak w tym przypadku czas hospitalizacji pacjenta jest znacznie krótszy, a ból pooperacyjny mniejszy. Wprowadzenie siatek chirurgicznych zrewolucjonizowało i usprawniło metody chirurgii jamy brzusznej i znacznie obniżyło ryzyko wystąpienia nawrotu przepukliny. Nie jest to jednak metoda pozbawiona wad, gdyż wraz z wprowadzeniem ciała obcego do organizmu możliwe jest wystąpienie szeregu powikłań, wśród których największy problem stanowią infekcje oraz przyrośnięcie implantu do narządów wewnętrznych lub otrzewnej [16]. Porównanie metod naprawy przepukliny przedstawiono w Tabeli 1. Sposób leczenia oraz wykorzystanie konkretnych materiałów chirurgicznych zależą od decyzji lekarza, podjętej na podstawie konkretnego przypadku klinicznego tzn. wielkości ubytku oraz predyspozycji pacjenta. Znane przedoperacyjne czynniki ryzyka wpływające na sposób leczenia to otyłość, palenie tytoniu, cukrzyca, upośledzenie odporności czy też niedawno przeżyta infekcja rany.

Tabela 1. Porównanie metod leczenia przepukliny

Metody napięciowe – zastosowanie szwów chirurgicznych	Metody beznapięciowe – zastosowanie siatek chirurgicznych
<ul style="list-style-type: none"> • zabieg przeprowadzany na otwartej jamie brzusznej przy znieczuleniu miejscowym; • mniej skomplikowana procedura; • zamykanie niewielkich ubytków; • dłuższa hospitalizacja, większy ból pooperacyjny i mniejszy komfort pacjenta; • większe ryzyko nawrotu; 	<ul style="list-style-type: none"> • zabieg przeprowadzany laparoskopowo w znieczuleniu ogólnym; • bardziej skomplikowana procedura; • zamykanie dużych ubytków; • krótsza hospitalizacja, mniejszy ból pooperacyjny i większy komfort pacjenta; • mniejsze ryzyko nawrotu, kosztem ryzyka wystąpienia poważniejszych powikłań takich jak infekcje i odrzut implantu, powstawanie zrostów i tworzenie przetok;

Już w XIX wieku widziano potrzebę stosowania implantu naśladującego właściwości mechaniczne powięzi i ścięgien w celu prawidłowego leczenia przepuklin. Niemniej jednak, pierwsza siatka chirurgiczna wykonana z materiału polimerowego została wytworzona dopiero w późnych latach 50-tych XX wieku. Do tego czasu opracowano kilka procedur chirurgicznych, w których wykorzystywano szwy wykonane z różnych materiałów. Początkowo był to jedwab, później wprowadzono szwy metalowe, ze stali nierdzewnej oraz modyfikowane srebrnym opłotem. Rozwiązania te były skuteczne, jednak powodowały powstawanie znacznych naprężeń w łączonych tkankach. Prowadziło to zwykle do niedokrwienia i/lub przecinania struktur biologicznych, a w rezultacie często powodowało nawrót urazu. Z tego względu zaczęto stosować wszywane siatki chirurgiczne, pierwotnie wykonane ze stali nierdzewnej, co było skuteczniejsze, jednak prowadziło do sztywności brzucha i odczuwania dużego dyskomfortu, a także silnej odpowiedzi immunologicznej organizmu. Pierwsze polimerowe implanty tego typu wyprodukowano pod koniec lat 50-tych z poli(tereftalanu etylenu) (PET) oraz polietylenu dużej gęstości (HDPE), zaś na początku lat 60-tych wprowadzono najpopularniejsze do dziś i uważane za najskuteczniejsze - siatki polipropylenowe (PP). 20 lat później wprowadzono kolejny materiał – ekspandowany poli(tetrafluoroetylen) (ePTFE) w postaci łątkowych z membrany *Gore-Tex*. Polimerowe siatki chirurgiczne zrewolucjonizowały chirurgię jamy brzusznej oraz leczenie przepuklin. Nie są one jednak pozbawione wad. Wymagania stawiane przed tego typu implantami są bardzo wysokie i różne w zależności od lokalizacji ubytku. Dlatego, opracowywane są coraz nowsze rozwiązania, mające na celu zwiększenie skuteczności zabiegu usunięcia przepukliny oraz ograniczenie ryzyka powikłań i negatywnych skutków zabiegu [17].

Celem wszczepienia siatki chirurgicznej jest wypełnienie w procesie gojenia luki powstałej pomiędzy rozerwanymi tkankami, a nie siłowe zamykanie wrót przepukliny. Implant ma za zadanie wzmocnienie oraz ustabilizowanie ściany jamy brzusznej w celu umożliwienia rozpoczęcia procesu regeneracji tkanek, po uprzednim usunięciu worka przepuklinowego, wypełniającego powstały kanał. Z tego względu, idealna siatka chirurgiczna powinna wykazywać szereg cech, umożliwiających prawidłowe spełnienie wcześniej założonych funkcji. Przede wszystkim musi mieć odpowiednie właściwości mechaniczne, być obojętna biologicznie, nie powodować odpowiedzi tkankowej, integrować się z uszkodzonymi strukturami biologicznymi, lecz nie tworzyć zrostów z otrzewną lub

narządami wewnętrznymi. W praktyce, niektóre z wymienionych cech wzajemnie się wykluczają, na przykład w kwestii wbudowywania się w ścianę jamy brzusznej przy jednoczesnym braku interakcji z innymi tkankami. Z tego względu istnieje wiele potencjalnych reakcji na ciało obce. Mogą wystąpić powikłania tj. zwłóknienia, zwapnienia, zakrzepica, infekcje, ziarniniakowacenie, tworzenie przetok czy też seromy. Na prawdopodobieństwo wystąpienia danego rodzaju skutków ubocznych wpływa zarówno materiał, z którego wykonany jest implant, jak i jego struktura [18]. Obecnie, wyróżnia się 4 główne typy wykorzystywanych w praktyce biomateriałowych siatek chirurgicznych: ulgające bioabsorpcji, ulegające bioabsorpcji, biologiczne oraz kompozytowe (kombinowane). Ważnymi parametrami, które należy wziąć pod uwagę przy doborze implantu do danego przypadku są: porowatość, „ciężar” rozumiany, jako stosunek wagi do powierzchni wyrażany w g/m^2 , oraz konstrukcja filamentu (monofilamentowe lub multifilamentowe) [14].

Obecnie, spośród biomateriałów polimerowych nieulegających bioabsorpcji, do konstruowania siatek chirurgicznych najczęściej wykorzystuje PP, PET oraz ePTFE. Materiały te posiadają zarówno wady jak i zalety. Każdy z wymienionych polimerów wykazuje wystarczające właściwości mechaniczne do pełnienia funkcji wzmacniającej w obrębie ściany jamy brzucha. PET jest najbardziej cytokompatybilny i bardzo dobrze dopasowuje się do krzywizn anatomicznych, jednak ze względu na silny wzrost tkanek ma tendencje do tworzenia zrostów oraz jest mniej stabilny mechanicznie długoterminowo niż pozostałe materiały. Hydrofobowy ePTFE słabo wbudowuje się w uszkodzoną ścianę mięśni brzucha i jednak dzięki temu prawdopodobieństwo niepożądanego interakcji z innymi tkankami jest w tym przypadku najmniejsze. PP wydaje się być materiałem stanowiącym niejako kompromis pomiędzy dwoma wymienionymi wcześniej, dlatego ze względu na znaczną uniwersalność jest obecnie najczęściej wybieranym polimerem w tej dziedzinie. Niestety, siatki chirurgiczne nieulegające bioabsorpcji wywołują dość silną reakcję tkanek na obecność ciała obcego. Aby zmniejszyć odpowiedź immunologiczną, wykorzystano polimerowe materiały biodegradowalne, mogące ulegać rozkładowi i zostać wchłonięte przez organizm. Dzięki temu, zmniejszono ryzyko wystąpienia przewlekłego bólu, ograniczeń ruchu czy też powstawania przetok. Ich stosowanie jest korzystne w przypadku dzieci, gdyż na dłuższą metę nie ograniczają wzrostu tkanek. Niemniej jednak ich wytrzymałość mechaniczna jest znacznie niższa niż w przypadku wymienionych wcześniej materiałów konstrukcyjnych i z czasem maleje ze względu na biodegradację, co mocno ogranicza pulę ich zastosowań. Przykładowymi polimerami wykorzystywanymi w tego typu implantach są polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), poli(węglan trimetyleny) (PTMC), poli(4-hydroksymaślan) (P4HB) czy też kopolimer poli(laktyd-co-glikolid) (PLGA). Inną strategią pozwalającą na ograniczenie występowania stanów zapalnych po implantacji jest wykorzystanie siatek pochodzenia biologicznego, stanowiących rusztowanie wytworzone z macierzy pozakomórkowej ECM (*ang. Extracellular Matrix*) i zawierających czynniki wzrostu przyspieszające proces gojenia. Wykazują one wysoką biogodność, wspomagają odkładanie się kolagenu oraz wzrost tkanki, a także mogą stać się unaczynione, co wyraźnie odróżnia tę generację implantów od dwóch poprzednich. Niestety, podobnie jak w przypadku syntetycznych siatek bioabsorbujących, ich zastosowanie jest ograniczone ze względu na słabe właściwości mechaniczne. Tego typu implanty pozyskiwane są zarówno z tkanek zwierzęcych (ksenogeniczne) lub z ludzkich zwłok (allogeniczne). Kolejną generacją siatek, w których łączone są

zalety materiałów ulegających i nieulegających biodegradacji są implanty kompozytowe i kombinowane oraz powlekane. Wykorzystują one różne struktury, gdzie np. powierzchnia jednej strony implantu ma inne właściwości niż druga, w celu ograniczenia tworzenia zrostów przy jednoczesnym umożliwieniu zajścia procesu gojenia. Powlekanie zaś pozwala na modyfikację hydrofilowości, a także na wprowadzenie czynników łagodzących reakcję na ciało obce (jak np. hydrożele czy też leki) [16].

Właściwości poszczególnych siatek chirurgicznych mogą być modyfikowane nie tylko na drodze doboru właściwych biomateriałów, ale również poprzez odpowiednie uformowanie i strukturę fizyczną implantu. Duże znaczenie ma wielkość porów, która jest bezpośrednio powiązana z pojęciem „ciężaru” siatki. Zaobserwowano, że implanty makroporowate i „lekkie” są korzystniejsze w stosowaniu, o ile ich właściwości mechaniczne są wystarczające, ponieważ wykazują większą elastyczność i łatwo dopasowują się do kształtu ściany jamy brzusznej oraz w słabiej oddziałują na tkankę ze względu na mniejszą powierzchnię kontaktu. Z tego względu sprzyjają procesom gojenia oraz umożliwiają swobodną penetrację makrofagów, przez co rzadziej obserwowane są infekcje. Niestety, w tym przypadku istnieje zwiększone ryzyko tworzenia się niepożądanych zrostów, które maleje przy zastosowaniu mikroporowatych, ciężkich implantów. Obecnie badane są siatki mikroporowate od strony otrzewnej i makroporowate od strony ściany jamy brzucha. Ważnym czynnikiem jest też typ filamentu zastosowanego w konstruowaniu implantu. Metodą wyłaczania ze stopu otrzymuje się zarówno siatki monofilamentowe, które są najpowszechniej stosowane ze względu na uniwersalne właściwości, a także multifilamentowe, które wykazują lepsze właściwości mechaniczne, jednak ze względu na występowanie szczelin, w których mogą rozwijać się bakterie, a także większą powierzchnię kontaktu z tkanką, sprzyjają infekcjom i reakcjom zapalnym oraz tworzeniu się ziarninaków [16].

Jak można zauważyć, idealna siatka chirurgiczna spełniająca wszystkie stawiane wymagania nie została jak dotąd opracowana. Podejmowane są jednak liczne badania naukowe w celu optymalizacji istniejących implantów oraz wprowadzenia nowych rozwiązań w leczeniu przepuklin. Główną tendencją jest zwiększenie wykorzystania biodegradowalnych polimerów ulegających wchłonięciu w warunkach biologicznych. Jedną z metod jest zastosowanie bioresorbowalnych powłok na standardowych siatkach wytworzonych z polimerów konstrukcyjnych, w celu zwiększenia ich biokompatybilności. Przykładem może być PP powlekany poli(glikolem etylenowym) (PEG), chitozanem lub macierzą pozakomórkową [19, 20, 21]. W celu opracowania wzmocnionego rusztowania komórkowego, podejmuje się również próby integracji siatek stosowanych klinicznie, z nanowłókninami otrzymanymi metodą elektroprzędzenia [12]. Otrzymano także samonośne implanty w postaci elektroprzędzonych materiałów polimerowych, w tym biodegradowalnych [22]. Aby przyspieszyć procesy gojenia, do biodegradowalnej frakcji włókien wprowadzane są czynniki wzrostu, a także komórki macierzyste. W celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia infekcji bakteryjnej oraz stanu zapalnego, możliwe jest powlekanie siatki nanocząstkami np. srebra, a także integracja implantu z polimerowym systemem kontrolowanego uwalniania leków – czynników antybakteryjnych i antybiotyków tj. ciprofloksacyna, ampicylina czy wankomycyna [19, 21, 23, 24]. Prowadzone są również badania nad otrzymywaniem spersonalizowanych implantów metodą druku 3D [25]. Ważną

i skuteczną metodą pozwalającą na wytworzenie zarówno rusztowań komórkowych jak i systemów kontrolowanego uwalniania leków jest wspomniane wcześniej elektroprzędzenie. Nanowłókna wyprodukowane w tym procesie mogą odgrywać kluczową rolę w przypadku kontroli adhezji, proliferacji, migracji czy też różnicowania komórek, ponieważ wykazują strukturę zbliżoną do macierzy pozakomórkowej (ECM) [26]. Posiadają one wysoki stosunek powierzchni do objętości, co pomaga w adsorpcji oraz immobilizacji komórek oraz pochodnych krwi jak osocze bogatopłytkowe (ang. *platelet-rich plasma*) zawierające trombocyty oraz czynniki wzrostu, co sprzyja regeneracji tkanek [27, 28].

2.1. Właściwości mechaniczne tkanek miękkich

Zadaniem, implantów w postaci siatek chirurgicznych jest przede wszystkim wzmacnianie uszkodzonych struktur biologicznych w czasie ich regeneracji oraz zapobieganie nawrotowi urazu będącego przedmiotem leczenia. Ich wytrzymałość musi być więc dostosowana do funkcji jaką mają spełniać w danym miejscu wewnątrz organizmu. Właściwości mechaniczne tkanek miękkich różnią się między sobą w zależności od ich rodzaju oraz lokalizacji, ponieważ są narażone na działanie różnych sił [29]. Dostosowanie wytrzymałości implantu do danej tkanki na podstawie danych eksperymentalnych wyznaczonych w różnego rodzaju próbach wytrzymałościowych jest utrudnione, ponieważ uzyskane wyniki są zazwyczaj jedynie przybliżeniem i nie dają pełnych informacji. Właściwości tkanek miękkich zależą głównie od ich struktury biologicznej, zawartości wody, elastyny oraz różnych typów kolagenu. Ulegają one zmianom, zachodzącym na skutek chorób, a także procesów starzenia. Próbkki biologiczne charakteryzują się zazwyczaj zmienną geometrią i anizotropią struktury. Z tego względu ich wytrzymałość różni się w zależności od kierunku działania siły. Niejednorodna grubość niektórych tkanek tj. np. mięśniowa powoduje, że często nie jest możliwe wyznaczenie pola przekroju poprzecznego w odcinku pomiarowym, którego wartość miałaby sens fizyczny i nie prowadziła do przekłamania uzyskanych wyników. Dlatego w wielu badaniach naukowych zrezygnowano z wyznaczania wartości naprężeń w badanej tkance i podano jedynie siłę powodującą rozerwanie jej struktury [30,31]. W Tabela 2 przedstawiono parametry wytrzymałościowe wybranych tkanek, pobranych *post mortem* od dawców będących w różnym wieku i stanie zdrowia, co wpłynęło na uzyskane wartości. Trzeba jednak pamiętać, że są to wartości skrajne, które nie występują w normalnych warunkach funkcjonowania organizmu. Można je odnieść jedynie do uszkodzeń wywołanych np. na skutek różnego rodzaju sytuacji patologicznych, w czasie których na ciało działają ekstremalnie wysokie siły. W warunkach codziennego funkcjonowania, zmierzono, że największe ciśnienie wynoszące około 23 kPa, działające na tkanki znajdujące się w obrębie jamy brzusznej, w granicach której dochodzi do urazu jakim jest przepuklina, ma miejsce podczas kaszlu oraz zeskoku z pewnej wysokości na płaską powierzchnię. Daje to średnią wartość około 2 N/cm² odczuwalnego maksymalnego nacisku na ścianę jamy brzusznej [32,33].

Tabela 2. Wytrzymałość mechaniczna przykładowych tkanek miękkich wyznaczona w próbie rozciągania

Typ tkanki/struktury biologicznej	Parametry	Wartości	Metoda pomiaru
Przepona [34]	E [MPa] σ_{BR} [MPa] / ϵ_{BR} [%]	12,0-38,0 1,8-4,1 / 3,8-12,0	Rozciąganie jednoosiowe
Skóra [35]	σ_{BR} [MPa] / ϵ_{BR} [%]	1,5-4,5 / 7,6-11,4	Dynamiczna rozciągania jednoosiowe
Kresa biała [36]	E [kPa] (P) E [kPa] (W)	~70,0 ~8,0	Rozciąganie jednoosiowe wykonane poprzecznie(P) i wzdłużnie (W)
Pochewka przednia mięśnia prostego [37]	E [MPa]	5,6-14,0	Rozciąganie jednoosiowe prostopadle do orientacji włókien
Pochewka tylna mięśnia prostego [38]	σ_{BR} [MPa]	6,1-6,5	Rozciąganie jednoosiowe
Powięź pępkowa [39]	E [MPa] (P) E [MPa] (R)	~2,9 ~9,3	Rozciąganie jednoosiowe prostopadle (P) i równoległe (R) do orientacji włókien
Powięź poprzeczna [39]	E [MPa] (P) E [MPa] (R)	~3,0 ~8,9	Rozciąganie jednoosiowe prostopadle (P) i równoległe (R) do orientacji włókien

gdzie: E - moduł Younga; σ_{BR} – naprężenie zrywające; ϵ_{BR} – odkształcenie zrywające

3. Biomateriały polimerowe

Zgodnie z definicją Europejskiego Towarzystwa Biomateriałów ESB (*ang. European Society for Biomaterials*), biomateriałem jest „każda substancja lub kombinacja substancji, inna niż lek, pochodzenia syntetycznego lub naturalnego, która może być stosowana przez dowolny czas, jako całość lub jako część systemu terapeutycznego, wzmacniającego lub zastępującego jakąkolwiek tkankę, narząd lub funkcję organizmu” [40]. Można wyszczególnić zarówno biomateriały pochodzenia nieorganicznego jak i organicznego. Do pierwszej grupy należą metale i ich stopy a także materiały ceramiczne, do drugiej zaś polimery i materiały węglowe. Można również wyszczególnić trzecią grupę w postaci kompozytów, łączących oba typy materiałów. Biomateriały polimerowe, najbardziej istotne z punktu widzenia niniejszej pracy, dzielą się na biodegradowalne i niebiodegradowalne. Ze względu na ich pochodzenie można również dokonać ich podziału na naturalne i syntetyczne [41]. Przykładowe polimery zaliczające się do wspomnianych grup przedstawiono w Tabeli 3 [42, 43, 44].

Niezależnie od pochodzenia, materiały tego typu powinny być biozgodne, nietoksyczne, hemokompatybilne oraz niewywołujące reakcji immunologicznej organizmu. W przypadku polimerów biodegradowalnych, również produkty ich rozkładu nie mogą wykazywać działania toksycznego, kancerogennego czy też immunogennego, dzięki czemu mogą one w bezpieczny dla zdrowia sposób ulec procesowi bioresorpcji (wchłonięcia przez organizm) [45]. Z drugiej strony, biomateriały polimerowe nieulegające biodegradacji powinny być biostabilne, aby nie powodować powikłań związanych z wprowadzeniem ich na dłuższy czas do organizmu. Zatem, ich biozgodność musi być stała w czasie [46]. W ostatnich latach zastosowanie biomateriałów polimerowych staje się coraz bardziej popularne w wielu dziedzinach nauki, zwłaszcza w biotechnologii, medycynie i farmacji [43,47]. Do tej pory znalazły one wykorzystanie m.in. w urządzeniach medycznych, implantach chirurgicznych, rusztowaniach komórkowych, czy też systemach kontrolowanego uwalniania leków [45,48,49].

Tabela 3. Podział biomateriałów polimerowych wraz z przykładami

Biomateriały polimerowe			
Pochodzenia naturalnego		Pochodzenia syntetycznego	
Polisacharydy	Proteiny	Biodegradowalne	Biostabilne niebiodegradowalne
- celuloza	- kolagen	- polilaktyd (PLA)	- silikon
- skrobia	- elastyna	- poliglikolid (PGA)	- poli(tetrafluoroetylen) (PTFE)
- agaroz	- keratyna	- poli(ϵ -kapolakton) (PCL)	- poliuretany (PU)
- alginiany	- jedwab	- poli(węglan trimetyleny) (PTMC)	- polietylen (PE)
- chitozan	- fibrynogeny	- kopolimery laktydu, glikolidu,	- polipropylen (PP)
- chityna	- kazeina	ϵ -kapolaktonu i węglanu trimetyleny	- polimetakrylany
- hialuroniany	- żelatyna	- poli(β -hydroksymaślan) (PHB)	- poliamidy (PA)
- karageniany		- poli(dioksanon) (PDO)	- poli(tereftalan etyleny) (PET)
- glikozaminoglikany		- poli(fumaran propyleny) (PPF)	- poli(alkohol winylowy) (PVA)
		- poli(hydroksyalkaniowy) (PHA)	- poli(glikol etylenowy) PEG
		- polibezwodniki	- poliwęglany (PC)

3.1. Charakterystyka poliestrów biodegradowalnych

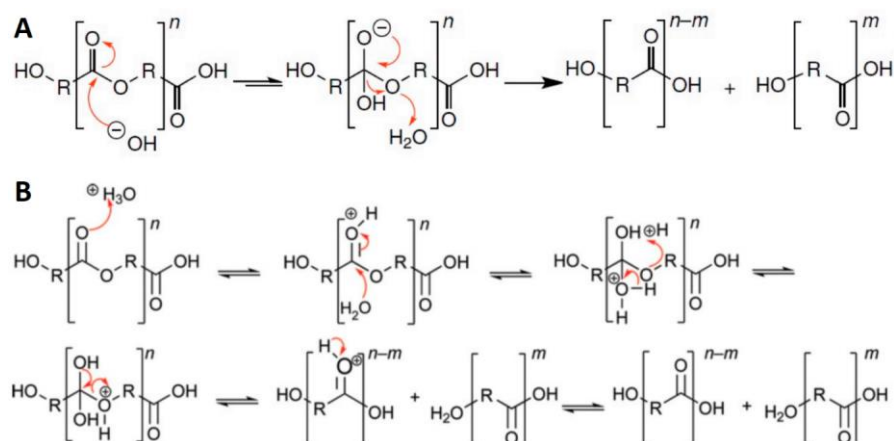
Do głównych sposobów otrzymywania poliestrów biodegradowalnych zalicza się polikondensację oraz polimeryzację z otwarciem pierścienia (ang. *Ring Opening Polymerization – ROP*). Niektóre polimery tej klasy można również zsyntezować mikrobiologicznie, za pośrednictwem działania mikroorganizmów, a także enzymatycznie, jednak w pierwszym przypadku ilość poliestrów, które da się otrzymać tym sposobem jest ograniczona, w drugim zaś, uzyskiwane są produkty o małej masie molowej [50, 51]. Z tego względu, pokrótce omówione zostaną tylko dwie główne metody.

Polikondensację przeprowadza się z wykorzystaniem dwufunkcyjnych monomerów, takich jak hydroksykwasy. Innym sposobem jest reakcja dioli z kwasami dikarboksylowymi, estrami lub chlorkami tych kwasów. Tego typu procesy, ze względu na powstawanie małowcząsteczkowych produktów ubocznych mają charakter równowagowy. Jest to pewna niedogodność, ponieważ aby uzyskać wysoki stopień polimeryzacji, muszą być one usuwane z przestrzeni reakcyjnej. Wiąże się to z dość wysoką temperaturą prowadzenia syntezy oraz długim czasem jej trwania. Generuje to kolejne utrudnienia, w postaci reakcji ubocznych oraz możliwości odparowywania monomerów, skutkujące utratą równowagi stechiometrycznej. W rezultacie, kontrola nad stopniem polimeryzacji oraz dyspersyjnością poliestrów otrzymywanych na drodze polikondensacji jest ograniczona. W praktyce, reakcję prowadzi się zazwyczaj do uzyskania polimerów o małej masie molowej, które następnie poddaje się reakcjom przedłużenia łańcucha. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie wysokiego stopnia polimeryzacji, a także wprowadzenie do łańcucha polimerowego innych wiązań niż estrowe. W ten sposób uzyskuje się np. poli(estro-węglany) lub poli(estro-uretany) [52].

Drugą metodą syntezy poliestrów biodegradowalnych jest wspomniana wcześniej reakcja ROP. Można ją prowadzić zarówno w masie jak i w roztworze. Jak sama nazwa wskazuje, wykorzystuje ona monomery cykliczne. Należą do nich takie grupy związków jak: laktony (wewnątrzcząsteczkowe estry hydroksykwasów karboksylowych), laktydy (cykliczne diestry kwasów karboksylowych), cykliczne keteno acetale czy też cykliczne estro węglany. Polimeryzacja ROP eliminuje wiele utrudnień, które były charakterystyczne dla polikondensacji. Oferuje bowiem możliwość otrzymywania wysokiego stopnia konwersji bez konieczności usuwania niskocząsteczkowych produktów ubocznych, które nie powstają w tym przypadku, a także krótszy czas reakcji w niższej temperaturze. Ze względu na ograniczenie zachodzenia reakcji ubocznych, łatwiej jest kontrolować stopień polimeryzacji oraz dyspersyjność syntezowanych poliestrów. Możliwe jest nawet osiągnięcie warunków „polimeryzacji żyjącej”, kiedy to reakcje uboczne w ogóle nie zachodzą. W zależności od warunków reakcji oraz zastosowanego inicjatora, ROP może przebiegać według różnych mechanizmów: jonowego (anionowego / kationowego), koordynacyjnego, wolnorodnikowego lub na drodze katalizy enzymatycznej. Każdy z wymienionych sposobów prowadzenia reakcji wymaga zastosowania odpowiednich inicjatorów. Z reguły są to substancje zawierające atomy metali tj. tlenki, kwasy Lewisa, alkoholany, karboksylany oraz inne metaloorganiczne związki kompleksowe, w tym etery koronowe. Stosowana jest także organokataliza przy użyciu nukleofilowych zasad (tj. N-heterocykliczne karbeny), związków supramolekularnych (np. tiomoczników, sulfonamidów), organicznych „super-zasad” oraz kwasów. W praktyce, ze względu na największą wydajność oraz uzyskiwanie wysokich mas molowych, najpopularniejszymi mechanizmami są polimeryzacja anionowa i koordynacyjna.

W pierwszym przypadku inicjatorami są zazwyczaj metale alkaliczne oraz ich tlenki lub etery koronowe. Ze względu na wysoką reaktywność polimeryzacja anionowa zachodzi bardzo szybko, jednak wewnątrzcząsteczkowa transestryfikacja powoduje, że powstaje większa liczba ubocznych produktów cyklicznych o niskiej masie. Zastosowanie w roli inicjatora metaloorganicznych związków kompleksowych metali tj. Al, Sn, Ti, Mg, Zr lub Zn powoduje, że powstały produkt pośredni zawierający centrum aktywne polimeryzacji koordynacyjnej posiada wiązanie kowalencyjne. Obniża to reaktywność i w rezultacie szybkość reakcji, ale jednocześnie eliminuje reakcje uboczne, zwiększając wydajność ROP. Polimeryzacja zachodzi tu zgodnie z mechanizmem koordynacyjno-insercyjnym. Jednak, gdy związki metaloorganiczne są wykorzystywane w roli katalizatora reakcji, ROP jest inicjowana przez dowolny nukleofil obecny w medium [53, 54].

Jedną z najważniejszych cech omawianej klasy polimerów jest zdolność do biodegradacji. Dzieje się to za sprawą reakcji rozerwania wiązania estrowego. Czynnikiem odpowiedzialnym za ten proces jest woda, dlatego reakcja nazywana jest hydrolizą, a cały proces degradacją hydrolityczną. Zachodzi ona na skutek interakcji cząsteczki wody z wiązaniem estrowym na powierzchni polimeru lub po wnikięciu do jego wnętrza. Rozpad tego wiązania może być katalizowany zarówno zasadami jak i kwasami (Rys. 2). Pierwszy wariant polega na ataku hydroksylogowego anionu OH^- na grupę karbonylową z wytworzeniem tetraedrycznego produktu pośredniego. Jest to etap odwracalny, bowiem odłączeniu może ulec zarówno anion hydroksylogowy, co prowadzi do regeneracji wiązania, jak i eter przyłączony do formy przejściowej, co skutkuje rozerwaniem wiązania estrowego z powstaniem grupy hydroksylogowej i karboksylogowej produktów. Odtworzenie wiązania zależy głównie od zdolności powstającego alkoholu do stabilizacji ujemnego ładunku. W przypadku hydrolizy katalizowanej kwasowo, reakcja rozpoczyna się od protonowania tlenu karbonylogowego grupy estrowej przez jon hydroniowy H_3O^+ . Powoduje to wzrost elektrofilowości węgla karbonylogowego, który następnie jest atakowany przez cząsteczkę wody. W rezultacie powstaje tetraedryczny produkt przejściowy, który podobnie jak w przypadku katalizy zasadowej rozpada się z wytworzeniem grupy hydroksylogowej i grupy karboksylogowej. Produkty hydrolizy poliestrów biodegradowalnych mają charakter kwasowy. Z tego względu ma miejsce zjawisko autokatalizy [55]. Innym wariantem jest hydroliza katalizowana enzymatycznie przy użyciu hydrolaz. Do tej klasy związków zalicza się m.in. esterazy, glukozydazy, proteazy, nukleazy, amylazy, fosfatazy czy lipazy. Enzymy mogą w znacznym stopniu przyspieszać hydrolizę polimerów, jednak należy zaznaczyć, że ich działanie jest specyficzne. Zaobserwowano, że niektórych przypadkach dany enzym wykazuje aktywność w procesie degradacji, a w innych nie. Wynika to z niemożliwości utworzenia produktu przejściowego w obrębie grupy karbonylogowej wiązania estrowego, na skutek zawad sterycznych lub zbyt słabego powinowactwa, gdyż poszczególne enzymy znacznie różnią się strukturą chemiczną i przestrzenną. Przykład stanowią badania Gana *et al.*, w których opisano szybką degradację PCL w medium zawierającym lipazę *Pseudomonas*, podczas gdy inkubacja w kontakcie z lipazą trzustkową świni i lipazą *Candida Cylindracea* nie przyniosła żadnych efektów [56]. Enzymy zazwyczaj nie są w stanie penetrować polimerowych elementów, dlatego degradacja katalizowana przy ich udziale zwykle przebiega jako proces powierzchniowy [57].



Rys. 2. Mechanizmy reakcji hydrolizy wiązania estrowego katalizowanej zasadowo (A) oraz kwasowo (B) [58]

Poliestry biodegradowalne stanowią klasę materiałów ulegających rozkładowi do nietoksycznych produktów ubocznych, wykazujących również takie właściwości jak biogodność i bioresorbowalność. Stąd wynikają ich potencjalne medyczne i farmaceutyczne zastosowania np. w formie matryc dla systemów kontrolowanego uwalniania leków, rusztowań komórkowych w inżynierii tkankowej czy też elementów implantów medycznych. Wiele polimerów oraz kopolimerów otrzymane na bazie monomerów takich jak laktyd (LA), glikolid (GL) czy też ϵ -kaprolakton (CL) zostało restrykcyjnie zbadanych, a ich właściwości szczegółowo opisane, czego skutkiem było ich dopuszczenie do zastosowań medycznych przez FDA [54]. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę najpowszechniej wykorzystywanych poliestrów biodegradowalnych.

3.1.1. Polilaktyd

Polilaktyd (PLA) jest liniowym poliestrem alifatycznym, otrzymywanym na drodze polikondensacji kwasu mlekowego lub polimeryzacji ROP laktydu. W pierwszym wariantcie otrzymywany jest polimer o niższej, a w drugim o wyższej masie molowej. Rozpatrując reakcje z udziałem laktydu, można zauważyć, że ze względu na obecność centrów chiralności istnieją trzy enancjomery: L,L-laktyd, D,D-laktyd oraz D,L-laktyd (forma mezo). Powoduje to, że możliwe jest otrzymanie kilku izomerycznych form PLA, których właściwości są zależne od stereochemicznego składu oraz rozkładu jednostek monomeru w łańcuchu. Z L,L-laktydu otrzymuje się izotaktyczny poli(L,L-laktyd) (PLLA), analogicznie z D,D-laktydu powstaje również izotaktyczny poli(D,D-laktyd) (PDLA). Z mieszaniny racemicznej powyższych enancjomerów uzyskiwany jest „głównie izotaktyczny” (ang. „*predominantly isotactic*”) poli(D,L-laktyd) (PDLLA), który na skutek transestryfikacji przyjmuje formę polimeru ataktycznego (przy założeniu 100% transestryfikacji), o strukturze amorficznej. Z mezo-laktydu, można otrzymać syndiotaktyczny poli(D,L-laktyd) (przy założeniu braku transestryfikacji). Z mieszaniny homochiralnych izotaktycznych PLLA i PDLA tworzą się zaś wysokotopliwe stereokompleksy ($T_m \sim 230^\circ\text{C}$). Inną opcją jest polimeryzacja L,L-laktydu z D,L-laktydem z wytworzeniem kopolimeru poli(L-laktyd-co-D,L-laktyd) (PLDLLA). Można zatem zauważyć, że w zależności od składu molowego mieszaniny reakcyjnej, rodzaju użytego inicjatora polimeryzacji i warunków syntezy, otrzymuje się całą różnorodność struktur

PLA [59]. Różnią się one zawartością fazy krystalicznej, temperaturami zeszklenia oraz topnienia oraz właściwościami mechanicznymi (Tabela 4).

Tabela 4. Porównanie podstawowych właściwości fizycznych różnych polimerów laktydu [60]

Właściwości	PLLA	PDLA	PDLLA	PLDLLA
Temperatura zeszklenia T_g [°C]	50-65	50-60	50-60	50-55
Temperatura topnienia T_m [°C]	106-122; 170-190	165-187	Amorficzny	-
Gęstość [g/cm ³]	1,25-1,29	1,24	1,27	1,30
Moduł Younga [GPa]	2,7-16,0	3,2-7,9	1,5-1,9	~2,3

PLLA jest polimerem termoplastycznym o wytrzymałości zbliżonej do polistyrenu. Można go przetwarzać różnymi metodami przetwórstwa temperaturowego tj. wtrysk, wytłaczanie, wtrysk z rozdmuchem, termoformowanie czy też przędzenie włókien. PDLLA ze względu na brak struktury krystalicznej ma słabsze właściwości mechaniczne i jest bardziej elastyczny. PLA jest materiałem, biodegradowalnym, rozkładającym się do nietoksycznych produktów, które w warunkach biologicznych mogą zostać przetworzone w cyklach metabolicznych komórek. Dodatkowo może być otrzymany z surowców odnawialnych. PLA ten jest produkowany na relatywnie dużą skalę, jak na polimer biodegradowalny. Dzięki swoim właściwościom wykorzystuje się go nie tylko na potrzeby zastosowań medycznych czy też w farmacji, ale również jest brany pod uwagę w produkcji opakowań jednorazowych, tekstyliów oraz filamentów do druku 3D [61,62].

3.1.2. Poliglikolid

Poliglikolid (PGA) jest liniowym, alifatycznym poliestrem o najprostszej strukturze. Nie wykazuje on aktywności optycznej. Podobnie jak w przypadku PLA, można go otrzymać w reakcji polikondensacji kwasu glikolowego oraz polimeryzacji ROP glikolidu. Polimer ten cechuje wysoka krystaliczność wynosząca zazwyczaj 45-55%. Z tego względu bardzo słabo rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych. Jego temperatura zeszklenia wynosi 35-40 °C, co jest wartością niższą w porównaniu do PLA, jednak topi się on w znacznie wyższych temperaturach, w zakresie 220-230 °C. Z tego względu, pomimo termoplastyczności i dobrych właściwości mechanicznych (moduł Younga 4,0-14,0 GPa), przetwarzanie metodami temperaturowymi jest utrudnione ze względu na degradację termiczną pojawiającą się w okolicy T_m . Ponadto, PGA jest bardziej hydrofilowy niż PLA i degraduje szybciej w warunkach degradacji hydrolitycznej. Wykazuje biogodność, z tego względu został wykorzystany już w 1954 roku do produkcji szwów chirurgicznych (Dexon®). Do innych zastosowań należą systemy kontrolowanego uwalniania leków, śruby chirurgiczne oraz rusztowania komórkowe. Ze względu na stosunkowo wysokie koszty produkcji (wyższe niż PLA) oraz trudne przetwórstwo temperaturowe i rozpuszczalnikowe, polimer ten, pomimo kilku zastosowań nie znalazł powszechnego wykorzystania w przemyśle [63].

3.1.3. Poli(laktyd-co-glikolid)

Kopolimer poli(laktyd-co-glikolid) (PLGA) jest jednym z najlepiej zbadanych i najpowszechniej wykorzystywanych poliestrów biodegradowalnych. Również w tym przypadku, w celu otrzymania

polimeru o wysokiej masie molowej wykorzystuje się polimeryzację z otwarciem pierścienia laktydu i glikolidu. Produkt niskocząsteczkowy zaś można uzyskać w bezpośredniej polikondensacji kwasu mlekowego i kwasu glikolowego. Ponieważ pierwszy z wymienionych monomerów występuje w postaci enancjomerów, PLGA, podobnie jak PLA może wykazywać różne właściwości w zależności od zastosowanego stereoisomeru laktydu. Generalnie, przy takim samym składzie molowym, kopolimery otrzymane z L,L-laktydu wykazują nieco lepsze właściwości mechaniczne, wyższe T_g i wolniejszą degradację. Posiadają one niewielką krystaliczność, pomimo tego, że zarówno PLLA jak i PGA należą do polimerów semikrystalicznych o znacznej zawartości fazy uporządkowanej. Podobnie jak w przypadku PDLLA, kopolimer PDLGA jest amorficzny. Właściwości zmieniają się również w funkcji składu molowego kopoliestru. Wzrost udziału jednostek laktydylowych powoduje, że materiał staje się bardziej hydrofobowy i degraduje wolniej. Jeśli chodzi o temperaturę zeszklenia, to zawiera się ona w przedziale pomiędzy wartościami odpowiadającymi T_g homopolimerów. Ze względu na niższą krystaliczność, PLGA wykazuje również nieco gorsze właściwości mechaniczne niż PLA i PGA. Niemniej jednak, może być w prosty sposób przetwarzany zarówno metodami termicznymi (termoplast) jak i rozpuszczalnikowymi. Jeśli chodzi o aplikacyjność tego kopolimeru, to ogranicza się ona głównie do zastosowań medycznych, w inżynierii tkankowej oraz na potrzeby farmacji. Amorficzna struktura sprzyja uwalnianiu leków, z tego względu na rynku wprowadzono już produkty, w których PLGA stanowi matrycę uwalniającą substancje o działaniu terapeutycznym. Przykładem mogą być formułacje służące do leczenia akromegalii (Somatuline® LA, Sandostatin® LAR), raka (Zoladex®, Suprecur® MP) czy też zaburzeń psychiatrycznych (Risperidal® Consta). Komercyjnie stosuje się również szwy chirurgiczne wykonane z PLGA (Vicryl®) [64,65].

3.1.4. Poli(ϵ -kaprolakton)

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) jest liniowym poliestrem, którego właściwości w dużej mierze wynikają z obecności w jednostce powtarzalnej stosunkowo długiego łańcucha alifatycznego, składającego się z sześciu grup metylenowych. Z tego względu, polimer ten jest silnie hydrofobowy, co w połączeniu ze strukturą semikrystaliczną (stopień krystaliczności zazwyczaj wynosi ponad 50%) powoduje, że czas jego degradacji hydrolytycznej jest znacznie wydłużony i może trwać do 3 lat. PCL podobnie jak wcześniej omawiane materiały można otrzymać na drodze polikondensacji kwasu 6-hydroksykapronowego, jednak ponownie, wyższe masy molowe są uzyskiwane metodą polimeryzacji ROP. W przypadku wykorzystania ϵ -kaprolaktanu w roli substratu, otwarcie pierścienia przeprowadza się zazwyczaj według mechanizmów jonowych lub koordynacyjnie, przy użyciu inicjatora metaloorganicznego. Możliwe jest również wykorzystanie cyklicznego ketenoacetanu 2-metylideno-1,3-diokssepanu, którego pierścień otwierany jest w wolnorodnikowej reakcji ROP. PCL charakteryzuje się niskimi temperaturami zeszklenia i topnienia, które wynoszą odpowiednio około $-60\text{ }^\circ\text{C}$ i $58\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$. Z tego względu polimer ten można bardzo łatwo formować metodami przetwórstwa termicznego, bez narażania materiału na degradację. Ze względu na stosunkowo dobrą rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, możliwe jest również przetwarzanie go z roztworów. PCL jest materiałem o gorszych właściwościach mechanicznych niż PLA czy PGA, wykazuje jednak wyższą elastyczność, dzięki czemu może znaleźć inne wykorzystanie, gdzie

sztynność materiału jest przeszkodą. Jako materiał biogodny, większość jego aplikacji skupia się na biomedycznych zastosowaniach m.in. w roli rusztowań komórkowych głównie do hodowli tkanki chrzęstnej i kostnej lub jako nośnik leku w systemach kontrolowanego uwalniania. PCL wykorzystuje się także do produkcji folii opakowaniowych i kompozytów. Zastosowanie znalazły też różnego rodzaju mieszaniny, zarówno z innymi polimerami biodegradowalnymi jak np. PLA, jak również konstrukcyjnymi jak polietylen [66].

3.1.5. *Poli(ϵ -kaprolakton-co-węglan trimetylenu)*

W celu modyfikacji hydrofilowości i stopnia krystaliczności, które rzutują na niską szybkość degradacji hydrolitycznej poli(ϵ -kaprolaktonu) a także na jego właściwości mechaniczne, często wykorzystywane są jego kopolimery z laktydem, glikolidem lub węglanem trimetylenu. Ostatni z wymienionych monomerów z punktu widzenia niniejszej pracy jest najbardziej istotny. Poli(ϵ -kaprolakton-co-węglan trimetylenu) (PCLTMC) należy do grupy alifatycznych poli(estro węglanów). Otrzymywany jest głównie w reakcji ROP węglanu trimetylenu (TMC) z ϵ -kaprolaktonem. W zależności od składu jest polimerem amorficznym lub semikrystalicznym, jednak o mniejszej zawartości fazy uporządkowanej niż PCL. Wykazuje dużą elastyczność i właściwości mechaniczne zbliżone do kauczuku. Mniejszy w stosunku do PCL stopień krystaliczności powoduje, że kopolimer znacznie lepiej wchłania wodę, co przy zmniejszonej hydrofobowości za sprawą obecności jednostek węglanowych, ułatwia hydrolizę wiązań estrowych obecnych w łańcuchu, niemniej jednak, jego degradacja hydrolityczna przebiega stosunkowo powoli. Wiązania węglanowe są dość odporne na działanie wody, jednak w obecności enzymów szybko ulegają rozkładowi, co przyspiesza degradację w warunkach biologicznych tego materiału. Ze względu na słabą kwasowość produktów degradacji bloków ϵ -kaproilowych oraz braku kwaśnych produktów degradacji bloków węglanowych, kopolimer wykazuje bardzo dobrą biogodność. Nie zachodzi również zjawisko autokatalizy reakcji hydrolizy (lub jej wpływ jest bardzo słaby), więc degradacja przebiega w bardziej przewidywalny sposób. Póki co, materiał ten nie jest szeroko wykorzystywany poza laboratorium i wciąż stanowi przedmiot badań m. in. pod kątem długoterminowego uwalniania leków oraz inżynierii tkankowej, w szczególności w dziedzinie regeneracji tkanki nerwowej [67].

3.2. *Poliuretany, jako biostabilne biomateriały nieulegające biodegradacji*

Przykładem biostabilnych, nieulegających biodegradacji materiałów polimerowych są poliuretany (PU). Stanowią one klasę kopolimerów, do których syntezy wykorzystywany jest diizocyjanian, polioliol oraz związek przedłużający łańcuch polimerowy (ang. *chain extender*). Pozwala to na otrzymywanie bardzo szerokiej gamy polimerów o różnej strukturze i właściwościach, co umożliwia zastosowanie poliuretanów w wielu dziedzinach przemysłu, medycyny oraz nauki. Diizocyjaniany są bardzo reaktywną klasą związków chemicznych, co wynika z obecności ugrupowania cyjanianowego R-NCO, w którym atom węgla jest silnym akceptorem, a azot silnym donorem elektronów, podczas gdy tlen jest słabym donorem elektronów. W czasie syntezy poliuretanów mogą reagować zarówno z polioliolami jak i czynnikami przedłużającymi łańcuch. Możliwe jest wykorzystanie zarówno diizocyjanianów aromatycznych, które dają lepsze właściwości mechaniczne, co odbywa się kosztem toksyczności

produktów, które powstają w czasie degradacji polimeru (są to aminy aromatyczne) lub alifatyczne, o nieco słabszych parametrach wytrzymałościowych, lecz zdecydowanie bardziej biogodne. W poliuretanach segmentowych, ze względu na silne oddziaływania międzycząsteczkowe, diizocyjaniany odpowiadają za tworzenie domen sztywnych, odpowiadających za wytrzymałość mechaniczną polimeru. Do najpowszechniej stosowanych diizocyjanianów zalicza się m. in. diizocyjanian heksametylenu, diizocyjanian naftaleno-1,5-diylu, diizocyjanian 4,4'-difenylo-metylenu czy też diizocyjanian tolueno-2,4-diylu. Związki służące do przedłużania łańcucha tj. np. 1,4-butanodiol, charakteryzują się zazwyczaj masami molowymi poniżej 400 g/mol. Odpowiadają one za kierowanie wzrostem i organizacją łańcucha w czasie syntezy. Działają jak fizyczny czynnik sieciujący, poprawiający właściwości mechaniczne. Stosowane są zarówno diole jak i diaminy, dające w rezultacie poli(uretano-moczniki). Poliole są makromonomerami o masie molowej od kilkuset do kilku tysięcy g/mol, zawierającymi w swojej strukturze ugrupowania eterowe (-R-O-R'-), estrowe (-R-COO-R'-) lub węglanowe (-R-O-CO-O-R'). Ze względu na słabe oddziaływania międzycząsteczkowe oraz możliwość rotacji wokół wiązań, poliole stanowią segmenty miękkie poliuretanów. Zatem, od polioliu zależy elastyczność materiału, a także jego podatność na degradację. Do najpowszechniej wykorzystywanych związków tego typu należą m.in. poli(tlenek tetrametylenu), poliole polialkilowe, poli(dimetylosiloksany) lub poliole poliwęglanowe. Rodzaj polioliu determinuje również generację poliuretanów do zastosowań medycznych, które są klasyfikowane ze względu na biostabilność. Pierwszą z nich stanowią poli(estro-uretany), które posiadają bardzo dobre właściwości mechaniczne, jednak są również podatne na hydrolizę. Z tego względu nie nadają się do wykorzystania w implantach medycznych stosowanych długoterminowo. Dlatego do użytku wprowadzono poli(etero-uretany), które są odporne na działanie wody. Zaobserwowano jednak, że po dłuższym czasie w warunkach *in vivo* na skutek działania makrofagów, które wytwarzają reaktywne formy tlenu, zachodzi degradacja oksydacyjna prowadząca do pęknięcia PU. Spowodowało to konieczność stosowania dodatków w postaci przeciwutleniaczy. Poli(węglano-uretany) (PCU) reprezentują trzecią generację termoplastycznych elastomerów poliuretanowych (TPU) w zastosowaniach medycznych, łącząc w sobie najlepsze cechy poprzedników. Wykazują większą odporność na hydrolizę niż poli(estro-uretany) i jednocześnie w mniejszym stopniu ulegają degradacji oksydacyjnej niż poli(etero-uretany). Z tego względu, obecnie są preferowanym rodzajem poliuretanów wykorzystywanym do zastosowań biomedycznych. Ulegają bardzo one powolnej degradacji, dlatego zachowują swoje właściwości przez długi czas, co jest pożądaną właściwością przy konstruowaniu implantów. Poliuretany ze względu na szerokie spektrum możliwości dostosowania do potrzeb zarówno właściwości mechanicznych jak i fizycznych tj. hydrofilowość, właściwości termiczne czy też krystaliczność, znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach. Wykorzystywane są m. in. jako miękkie pianki opakowaniowe, w produkcji płyt i pianek izolacyjnych, wykładzin podłogowych, powłok, membran i tekstyliów, a także w przemyśle automotive. Istnieje również wiele medycznych zastosowań medycznych poliuretanów tj. opatrunki, implanty w medycynie estetycznej, elementy urządzeń do dializy i rozruszników serca, katetery, baloniki do angioplastyki, protezy naczyniowe i tekstylia szpitalne [68,69].

4. Systemy kontrolowanego uwalniania leków

Lek jest to substancja chemiczna, sklasyfikowana w oficjalnej farmakopei, która po wprowadzeniu do organizmu pozwala na uzyskanie efektu terapeutycznego, diagnostycznego lub zapobiegającego chorobie, podawana w ściśle określonych dawkach według wytycznych FDA. Wraz z substancjami pomocniczymi tworzy postać leku, zwaną również postacią farmaceutyczną lub dawkowania. Można je podzielić zarówno ze względu na sposób formowania na: stałe (np. tabletki, kapsułki, proszki, granulaty), półstałe (np. maści, kremy, żele) oraz ciekłe (np. roztwory, syropy, zawiesiny), a także według drogi podawania: doustne, wziewne, przezskórne, pozajelitowe, do oczu, nosa itp. Forma aplikacyjna leku zależy głównie od docelowego miejsca działania substancji czynnej [70, 71].

Do końca lat 40-tych XX wieku uważano, że dostępność leku uwolnionego z tabletki w warunkach biologicznych zależy jedynie od rozpadu struktury postaci farmaceutycznej. Dlatego zaczęto wprowadzać pewne procedury *in vitro* oraz *in vivo*, mające na celu ewaluację tego procesu [72]. Jednak, Edwards w 1951r. prowadząc badania nad rozpuszczaniem i dyfuzją aspiryny wysnuł wniosek, że jeżeli po doustnym podaniu postaci dawkowania proces wchłaniania leku z przewodu pokarmowego jest szybki, to szybkość rozpuszczania może stanowić etap limitujący wzrost jego stężenia we krwi [73]. Koncepcja ta była rozwijana przez wielu badaczy, czego skutkiem było sformułowanie pojęcia biodostępności, rozumianego, jako ułamek dawki leku docierający do ustroju biologicznego. W następnych latach przeprowadzono wiele eksperymentów, które pokazały, że zmiany w składzie oraz sposobie otrzymywania produktu leczniczego mogą w znacznym stopniu wpływać na szybkość rozpuszczania oraz dostępność biologiczną substancji terapeutycznej. Przykładem mogą być badania McLeoda *et al.*, w których dokonano porównania produktów leczniczych (kapsulek) zawierających 250 mg ampicyliny, wyprodukowanych zarówno przez jednego, jak i kilku różnych producentów. Zaobserwowano kilkuprocentowe różnice w czasie rozpuszczania oraz biodostępności antybiotyku [74]. Nie był to odosobniony przypadek, gdyż w pracy Lindebauma *et al.*, również potwierdzono znaczne różnice w dostępności biologicznej digoksyny, wyprodukowanej przez jednego producenta [75]. Takie doniesienia skłoniły do interwencji FDA, czego skutkiem były prace porównawcze dotyczące tabletek zawierających digoksynę, pochodzące od 32 producentów dostępnych na rynku północnoamerykańskim. Ujawniono znaczne różnice w profilach rozpuszczania [76]. Niekorzystne wyniki, sugerujące słabą kontrolę nad uwalnianiem leku spowodowały, że położono większy nacisk na badanie wpływu substancji pomocniczych, wprowadzanych do postaci leku. Głównym skutkiem tej sytuacji było również wprowadzenie standaryzacji poprzez oficjalne testy rozpuszczania, w tym przewidywanie tzw. „efektu żywności” dla doustnej drogi podawania leku, zawiedzone przez USP (ang. *United States Pharmacopeia*) oraz NF (ang. *National Formulary*) [77]. Dalsze badania doprowadziły do powstania i rozwoju koncepcji potencjału absorpcyjnego leku, pozwalającego na ilościowe oszacowanie ułamka dostarczonej dawki, a także opracowania modelu mikroskopowego, opartego na bilansie masy, który dla leków przyjmowanych doustnie uwzględniał parametry takie rozpuszczanie, wchłanianie i liczbę dawek [78,79]. W połowie lat 90-tych dokonano klasyfikacji leków według Systemu Klasyfikacji Farmaceutycznej, biorąc pod uwagę rozpuszczalność w wodzie, przepuszczalność jelitową, co wskazywało na przewidywanie korelacji *in vitro* – *in vivo*.

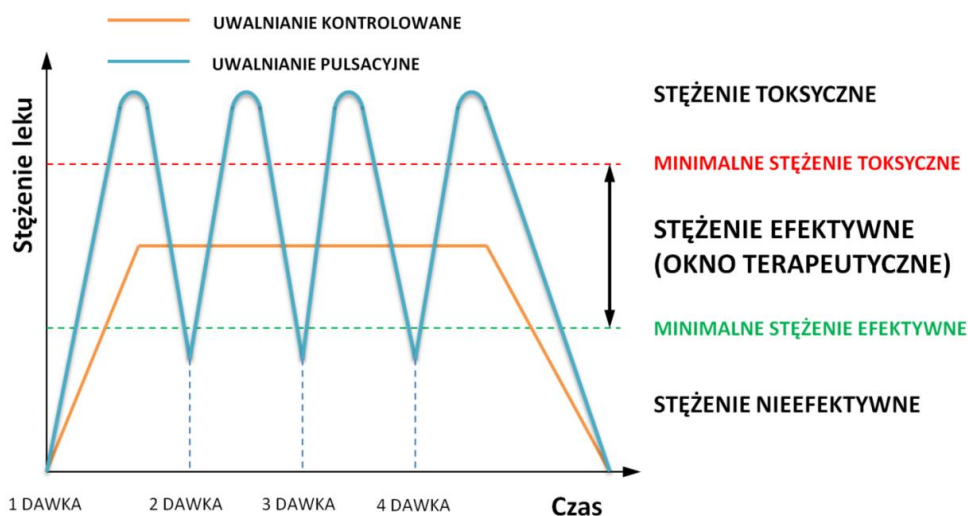
W celu lepszego poznania tej zależności, dokonano wielu badań w sztucznych płynach, symulujących stan żołądka i jelita cienkiego, zarówno na czczo, jak i po posiłku. W późniejszych latach rozpoczęto intensywne prace, nad systemami, dzięki którym substancja o działaniu terapeutycznym mogłaby być w sposób kontrolowany dostarczona do docelowego miejsca działania, gdzie w przewidywalny i powtarzalny sposób mogłaby uwalniać lek [80,81].

4.1. Charakterystyka ogólna procesu uwalniania leków

Uwalnianie leku polega na emisji jego dawek z produktu leczniczego w założonym czasie, w taki sposób, aby substancja biologicznie aktywna mogła ulec absorpcji i dystrybucji w ustroju biologicznym dając efekt farmakologiczny, a następnie zostać zmetabolizowana i wydalona. W szerszym kontekście pojęcie to odnosi się do różnego rodzaju strategii formulacji, systemów wytwarzania oraz przechowywania, a także technologii mających na celu wprowadzenie substancji farmaceutycznej do miejsca docelowego w obrębie organizmu, w sposób umożliwiający osiągnięcie pożądanego efektu terapeutycznego [82]. W zależności od potrzeb wynikających ze strategii prowadzenia leczenia, stosowane są różne sposoby wprowadzania leków do organizmu. Pierwszy z nich polega na natychmiastowym uwolnieniu pełnej dawki z produktu leczniczego zaraz po podaniu. Przebieg tego procesu zależy głównie od szybkości rozpuszczania substancji farmaceutycznej (uwalnianie niezmodyfikowane) [83]. Istnieją również zmodyfikowane metody, gdzie lek uwalnia się w czasie innym niż bezpośrednio po podaniu (uwalnianie opóźnione) lub jest dawkowany przez dłuższy czas, co pozwala na utrzymanie stałego poziomu substancji leczniczej w organizmie (uwalnianie przedłużone) [84]. Najbardziej zaawansowane systemy charakteryzują się kontrolowanym uwalnianiem, ze z góry określoną szybkością w przewidzianym czasie [85]. W zależności od konstrukcji, umożliwiają one dawkowanie substancji aktywnej w czasie od kilku godzin, nawet do kilkunastu miesięcy. Aby zwiększyć skuteczność, bezpieczeństwo oraz wygodę pacjenta, opracowywane są systemy kontrolowanego uwalniania, których zadaniem jest optymalizacja farmakokinetyki, biodostępności i czasu działania substancji leczniczej, co ma prowadzić do poprawy wyników terapii. Tworzą one tzw. system terapeutyczny i składają się z dwóch głównych części: nośnika substancji leczniczej i elementu kontrolującego uwalnianie. Jednak, do prawidłowego działania wymagane jest również źródło siły powodującej transport leku do otoczenia [86,87,88].

Aby farmakoterapia była skuteczna, stężenie leku w docelowej tkance musi zawierać się w pewnych granicach, zwanych oknem terapeutycznym, poniżej którego leczenie staje się nieefektywne, natomiast wyższe stężenia stają się toksyczne dla organizmu. Innymi słowy, tzw. okno terapeutyczne jest ograniczone przez minimalne stężenie efektywne i minimalne stężenie toksyczne leku [89]. Kluczem do skutecznego leczenia jest dostarczanie do organizmu optymalnej, najlepiej stałej dawki substancji leczniczej, mieszczącej się we wspomnianych granicach. Jednak, przyjmowanie niezmodyfikowanej postaci leku o szybkim uwalnianiu substancji aktywnej skutkuje skokiem jej stężenia w organizmie, często powyżej bezpiecznej wartości, po czym spada ono poniżej efektywnego poziomu. Taka sytuacja wymaga cyklicznego podawania kolejnych dawek. Systemy kontrolowanego, przedłużonego uwalniania leków umożliwiają utrzymanie terapeutycznego stężenia

leku, dzięki czemu obniżają jego toksyczność i efekty uboczne, zarazem zwiększając skuteczność (Rys. 3) [90].



Rys. 3. Koncepcyjne przedstawienie zmian stężenia leku w osoczu odpowiadające kontrolowanemu oraz pulsacyjnemu uwalnianiu

Warunkiem, aby mogło dojść do uwalniania jest oddziaływanie systemu z otaczającym medium, najczęściej wodą lub płynem ustrojowym, który jest zdolny do wnिकania do wnętrza. Cząsteczka leku przemieszcza się w kierunku powierzchni zewnętrznej, a następnie zostaje przetransportowana do otaczającego środowiska. Na proces ten wpływa wiele czynników, które wynikają zarówno z budowy chemicznej oraz właściwości fizycznych leku, warunków otoczenia jak i samej farmaceutycznej formy dozowania (Tabela 5). W rzeczywistości emisja leku jest zazwyczaj spowodowana kilkoma czynnikami na raz, wśród których może dominować jeden główny. W rezultacie istnieje wiele mechanizmów, według których może zachodzić uwalnianie substancji terapeutycznych. Wynikają one ze wzajemnego stosunku szybkości procesów fizycznych mających miejsce podczas transportu leku do otoczenia. Powoduje to trudność z przewidywaniem, w jaki sposób uwalniać się będzie dana substancja lecznicza z danego systemu w założonym czasie [91,92,93,94].

Tabela 5. Zestawienie czynników wpływających na proces uwalniania leków

Czynniki wpływające na uwalnianie		
Właściwości leku	Warunki otoczenia	Farmaceutyczna forma dozowania
-postać polimorficzna -krystaliczność -wielkość cząsteczki -rozpuszczalność -zawartość w farmaceutycznej formie leku	-temperatura -pH -lepkość -siła jonowa	-kształt -wymiar -porowatość -hydrofilowość nośnika -gęstość nośnika -obecność substancji pomocniczych, modyfikujących

4.2. Polimerowe systemy uwalniania leków

Z punktu widzenia niniejszej pracy najistotniejszym rodzajem systemów kontrolowanego uwalniania leków są te, które zostały wytworzone w oparciu o polimery biodegradowalne. Jeżeli chodzi o ich budowę, to można je zasadniczo podzielić na zbiornikowe oraz matrycowe. W pierwszym wariacie substancja o działaniu terapeutycznym jest oddzielona od otoczenia za pomocą polimerowej membrany. W systemach matrycowych (nośnikowych) lek wprowadzony jest bezpośrednio do polimeru i rozproszony mniej lub bardziej homogenicznie w całej objętości materiału. Podziału dokonuje się również według kryterium dotyczącego szybkości procesu limitującego uwalnianie leku. Zatem, można rozróżnić takie polimerowe systemy, gdzie czynnikiem ograniczającym jest dyfuzja, szybkość rozpuszczania, interakcji z rozpuszczalnikiem (pęcznienie, osmoza) lub szybkość reakcji chemicznych tj. hydroliza [95].

Dyfuzyjne kontrolowanie uwalniania leków dotyczy zarówno otoczonych polimerową membraną zbiorników tj. np. mikrosfery, jak również matryc (nośników). W obu przypadkach mechanizm działania wynika z występowania gradientu stężenia leku pomiędzy systemem a otoczeniem. W systemach zbiornikowych dyfuzja odbywa się przez membranę, w matrycowych zaś przez całą jej objętość. Często dodatkowym czynnikiem decydującym o szybkości uwalniania jest stosowanie stężenia leku większego niż poziom nasycenia (przekraczającego iloczyn rozpuszczalności). Innymi słowy, ilość substancji aktywnej jest wyższa, niż potrzebna dla uzyskania roztworu nasyconego. Powoduje to, że lek jest obecny w systemie zarówno w postaci rozpuszczonej, jak i nierozpuszczonej, przy czym dalsze rozpuszczanie jest możliwe dopiero po przesunięciu uzyskanego stanu równowagi na skutek dyfuzji środka farmaceutycznego do otoczenia. Uwalnianie może być również limitowane przez szybkość rozpuszczania matrycy. Najczęściej dotyczy ono polimerów trudno rozpuszczalnych, które mogą stanowić część zarówno zbiornikowej jak i matrycowej postaci systemu. W pierwszym wariacie uwalnianie odbywa się na skutek rozpuszczenia zewnętrznej otoczki, wewnątrz której zawarto substancję aktywną, w drugim zaś, lek jest „kapsułkowany” w całej objętości matrycy, a jego emisja do otoczenia następuje wraz z postępowaniem jej rozpuszczania. W systemach tego typu również zachodzą procesy związane z dyfuzją leku, które jednak ze względu na mniejszą szybkość, odgrywają zazwyczaj drugorzędną rolę. Uwalnianie limitowane aktywnością rozpuszczalnika odbywa się na drodze procesów osmozy i pęcznienia matrycy. Jest ono zatem wywołane penetracją systemu uwalniania przez medium (wodę lub płyny ustrojowe). Ciśnienie osmotyczne może powstawać na skutek obecności półprzepuszczalnych polimerowych membran, które umożliwiają transport wody, lecz blokują dyfuzję leku, który na skutek powstania siły napędowej wywołanej gradientem stężeń może wydostawać się z systemu, najczęściej w postaci zbiornikowej, przez specjalne kanały. Pęcznienie matrycy (zwykle nierozpuszczalnej) wynika z absorpcji wody i wiąże się z wzrostem jej objętości, co powoduje obniżenie gęstości. Dzięki temu, maleją opory dyfuzyjne, co umożliwia kontrolowany transport leku do otoczenia. Uwalnianie leku limitowane zmianą warunków otoczenia, polega na inicjacji procesu dopiero w wyniku pojawienia się czynnika aktywującego, wpływającego na polimerową składową systemu uwalniania. Może to być zmiana temperatury, pH, zajście reakcji utleniania-redukcji, kontakt ze światłem, enzymami lub powstaniem naprężeń mechanicznych. Uwalnianie może być też limitowane szybkością procesów degradacji i erozji. Zachodzą one na skutek

reakcji chemicznych w materiale polimerowym, prowadzących do rozerwania wiązań kowalencyjnych w łańcuchu. Jako że uwalnianie najczęściej odbywa się w wodnym środowisku biologicznym, jest to najczęściej hydroliza lub enzymoliza. W tym przypadku, lek może być zarówno zdyspergowany w matrycy, jak również kowalencyjnie z nią związany. W rezultacie, uwalnianie może się odbywać na skutek erozji nośnika, a także rozerwania wiązań kowalencyjnych, za pomocą których substancja lecznicza jest związana z polimerem. Niezależnie od tego, w jakiej formie wprowadzono lek, oba procesy zachodzą równocześnie, przy czym erozja może zachodzić w całej masie polimeru, gdy szybkość wnikania wody do matrycy jest większa niż szybkość rozkładu wiązań, lub powierzchniowo -w odwrotnej sytuacji. Zazwyczaj mają miejsce oba warianty, przy czym jeden z nich jest dominujący. Niemniej jednak, z punktu widzenia uwalniania leków bardziej korzystny wydaje się mechanizm erozji powierzchniowej, gdyż jest bardziej przewidywalny. Ponadto, leki nietrwałe w obecności wody są lepiej chronione przez matrycę, która dodatkowo wolniej traci swoje właściwości mechaniczne. Należy również wspomnieć, że równoległe do degradacji i erozji zachodzą procesy dyfuzji leku przez polimer. Z tego względu uwalnianie kontrolowane degradacją i erozją ma kluczowe znaczenie wtedy, gdy opory dyfuzyjne dla leku w matrycy są wysokie, a nośnik ulega szybkiemu rozkładowi [96,97].

4.3. Uwalnianie leków z polimerowych matryc

Idealny system kontrolowanego uwalniania powinien dostarczać substancję terapeutyczną do miejsca jej działania z prędkością dostosowaną do potrzeb organizmu w czasie całego leczenia. Takie założenie prowadzi do zwiększenia skuteczności i bezpieczeństwa stosowania danej substancji o działaniu terapeutycznym. Uwalnianie leków z polimerowych, biodegradowalnych matryc jest procesem skomplikowanym, ponieważ na jego przebieg wpływa wiele, często skorelowanych ze sobą czynników. W celu zaprojektowania dostosowanego do konkretnych potrzeb polimerowego systemu terapeutycznego należy wziąć pod uwagę zarówno parametry leku, matrycy jak i całej formułacji.

4.3.1. Parametry leku

Budowa chemiczna leku ma kluczowe znaczenie, gdyż wynikają z niej jego właściwości fizyczne i chemiczne. Masa molowa i struktura przestrzenna, a co za tym idzie rozmiar cząsteczki odgrywają ważną rolę w procesach dyfuzyjnych, zarówno w matrycy polimerowej jak i medium. Obecność poszczególnych ugrupowań chemicznych o charakterze polarnym lub niepolarnym wpływa zaś na właściwości hydrofilowo-hydrofobowe oraz na zdolność do tworzenia różnego rodzaju oddziaływań międzycząsteczkowych typu: lek-lek, lek-rozpuszczalnik (zazwyczaj woda), czy też lek-matryca, które mogą utrudniać przemieszczanie się cząsteczek. Rzutuje to zarówno na stan skupienia i krystaliczność substancji leczniczej w danej temperaturze, jej zdolność do dyspergowania się w matrycy, szybkość rozpuszczania i rozpuszczalność w danym ośrodku, oraz tendencję do tworzenia aglomeratów. Biorąc pod uwagę parametry leku, można wyszczególnić kilka prawidłowości. Mianowicie, im większa masa molowa i rozmiar cząsteczki, a także jej powinowactwo do danego ośrodka, tym dyfuzja zachodzi wolniej. Wraz ze wzrostem rozpuszczalności szybkość uwalniania rośnie, a im większa jest powierzchnia właściwa aglomeratów i mniejsza krystaliczność, tym

rozpuszczanie zachodzi szybciej. Hydrofilowe leki ułatwiają wnikanie wody do matrycy, co obniża opory dyfuzyjne i przyspiesza uwalnianie, hydrofobowe zaś powodują odwrotny efekt [98].

4.3.2. *Parametry matrycy polimerowej*

Matryca polimerowa stanowi ośrodek, który oddziela lek od otaczającego środowiska. Jej funkcją jest zatem spowolnienie procesu uwalniania oraz uzyskanie nad nim pewnej kontroli. W przypadku polimerów biodegradowalnych, uwalnianiu leku towarzyszy rozkład matrycy na drodze reakcji chemicznych tj. hydroliza lub enzymoliza. Prowadzi to do procesów erozyjnych i zmienia zarówno jej postać makroskopową, jak również właściwości fizyczne i chemiczne. Parametry polimeru, podobnie jak w przypadku leku, wynikają z jego struktury chemicznej. Główną rolę odgrywa średnia masa molowa, dyspersyjność, obecność określonych wiązań chemicznych czy też rozgałęzień, a w przypadku kopolimerów także wzajemny stosunek molowy komonomerów. Wypadkową tych parametrów jest hydrofilowość / hydrofobowość polimeru, odzwierciedlająca zdolność do jego rozpuszczania, bądź absorbowania wody, a także podatność na degradację i erozję. Obecność określonych grup funkcyjnych stwarza możliwość tworzenia oddziaływań międzycząsteczkowych polimer-polimer, polimer-lek czy też polimer-medium. Struktura chemiczna determinuje również gęstość oraz tendencję do tworzenia fazy uporządkowanej (krystalicznej), a także określa właściwości termiczne, od których zależy ruchliwość łańcuchów polimerowych w danej temperaturze. Wszystkie wymienione powyżej parametry wpływają na dwa główne mechanizmy, według których zachodzi uwalnianie leków z biodegradowalnych matryc polimerowych. Są one ściśle związane z procesami degradacji i erozji materiału oraz z dyfuzją leku [99,100,101,102,103,104]. Ważnym sposobem wpływu na właściwości polimeru jest kopolimeryzacja, która umożliwia modyfikację zarówno właściwości mechanicznych oraz parametrów fizycznych takich jak hydrofilowość czy też stopień krystaliczności [105]. Podobne zabiegi można przeprowadzić wykorzystując mieszaniny polimerowe [106]. Niemniej jednak, ze względu na brak mieszalności termodynamicznej większości polimerów, często pojawia się separacja fazowa, a wpływ na właściwości materiału jest mniejszy niż w przypadku kopolimeryzacji. Często wymagane jest użycie specjalnych małocząsteczkowych kompatybilizatorów np. w postaci kooligomerów blokowych. Ich obecność wpływa jednak na właściwości fizyczne systemu i w rezultacie zmienia szybkość uwalniania leku. Ze względu na to, że matryca polimerowa może być wykonana z homopolimerów, kopolimerów lub różnego rodzaju mieszanek, na uwalnianie może wpływać bardzo wiele czynników. Stąd pojawia się trudność z wyciągnięciem uniwersalnych prawidłowości rządzących tym procesem, wynikających bezpośrednio z parametrów zastosowanego polimeru. Niemniej jednak można zauważyć, że wzrost średniej masy molowej powoduje spowolnienie erozji materiału. Tym samym obniża szybkość uwalniania, gdy w znaczący sposób zależy ono od procesów degradacyjnych. Podobny efekt daje zwiększenie hydrofobowości utrudniającej wnikanie cząsteczek wody do materiału polimerowego, co skutkuje spowolnieniem degradacji i uwalniania leku. Bardziej rozgałęziona struktura łańcuchów ze względu na zawady steryczne powoduje obniżenie gęstości polimeru, dzięki czemu zmniejszone zostają opory dyfuzyjne. Odwrotny efekt generuje struktura krystaliczna, która generuje znaczny wzrost oporów dyfuzyjnych leku w matrycy. Ważną rolę odgrywa również stan, w jakim znajduje się polimer w trakcie procesu uwalniania leków. Opory dyfuzyjne różnią

się pomiędzy stanem szklistym (większe opory) a lepkosprężystym (mniejsze opory), dlatego ważnym parametrem, który należy brać pod uwagę przy konstruowaniu polimerowego systemu jest temperatura zeszklenia (T_g) matrycy.

4.3.3. *Parametry formulacji polimerowego systemu uwalniania leków*

Na szybkość uwalniania leku wpływa również postać makroskopowa systemu, jego morfologia powierzchni, wewnętrzna struktura przestrzenna, a także obecność dodatków modyfikujących w matrycy. Parametry te wynikają przede wszystkim z metody, jaką dany system został otrzymany. Wymiary, kształt, porowatość, stosunek powierzchni do objętości wpływają przede wszystkim na drogę dyfuzji leku zanim przedostanie się z matrycy do otoczenia. Jej wydłużenie będzie skutkowało wolniejszym uwalnianiem. Bardziej rozwinięta powierzchnia często sprzyja przyspieszeniu degradacji matrycy, jednak może również powodować, że większa ilość niezwiązanego z matrycą leku zostanie szybko rozpuszczona i uwolniona w postaci tzw. wyrzutu początkowego, co może nie być pożądane, zwłaszcza, gdy lek w dużym stężeniu wykazuje działanie toksyczne. Wprowadzenie substancji pomocniczych również odgrywa ogromną rolę. Modyfikują one przeważnie właściwości matrycy zwiększając lub zmniejszając jej hydrofilowość, co może mieć wpływ zarówno na szybkość degradacji jak i zdolność do pęcznienia na skutek absorpcji wody. Wprowadzenie plastyfikatorów może obniżyć opory dyfuzyjne, zaś nukleantów krystalizacji lub środków wiążących, oddziałujących z lekiem, zwiększać je [107,108,109,110,111].

Jak można zauważyć, istnieje wiele parametrów, które należy wziąć pod uwagę opracowując polimerowy system kontrolowanego uwalniania leków. Część z nich jest uniwersalna i dotyczy większości typów postaci leku, także nie polimerowych. Pomimo skomplikowania, daje to ogromne możliwości w opracowywaniu systemów farmaceutycznych o pożądanych dla danej aplikacji parametrach.

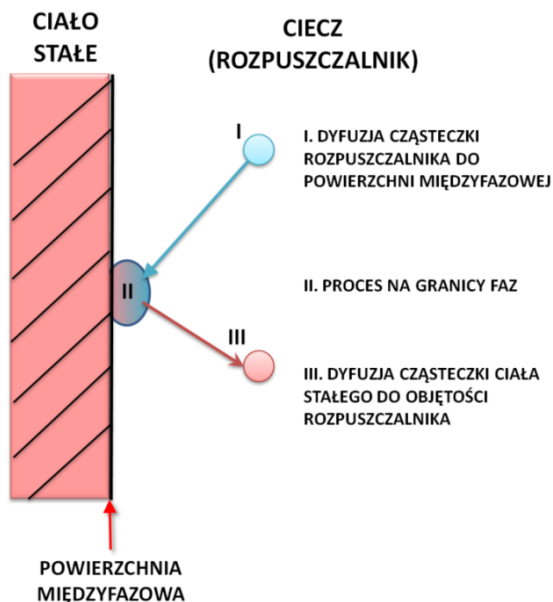
4.4. *Charakterystyka procesów rządzących kinetyką uwalniania leków*

4.4.1. *Rozpuszczanie i dyfuzja*

Rozpuszczanie ciała stałego (np. leku), jest to kinetyczny proces przenoszenia jego masy z fazy stałej do fazy ciekłej (medium / rozpuszczalnika), zachodzący na granicy faz, z pewną szybkością w określonych warunkach otoczenia (temperatury i składu rozpuszczalnika). Zachodzi w dwóch głównych etapach: reakcji międzyfazowej powodującej uwolnienie cząsteczek z fazy stałej oraz fazy transportu substancji rozpuszczonej z dala od granicy międzyfazowej na drodze dyfuzji lub konwekcji (Rys. 4). Ogólna szybkość rozpuszczania zależy od szybkości najwolniejszego z tych etapów [112].

Wpływ na kinetykę tego procesu mają czynniki takie jak szybkość przepływu medium (rozpuszczalnika) w kierunku granicy faz, procesu na granicy faz i dyfuzji cząsteczek substancji z granicy faz to objętości rozpuszczalnika, wynikające z wartości parametrów tj. powierzchnia właściwa ciała stałego, pH, siła jonowa, lepkość i skład rozpuszczalnika, mieszanie (burzliwość przepływu), temperatura oraz dodatek substancji pomocniczych jak np. środki powierzchniowocenne [113, 114, 115, 116, 117]. Drugim ważnym pojęciem jest rozpuszczalność, która opisuje stan równowagowy nasycenia roztworu, wyrażający maksymalną ilość substancji (wyrażoną w gramach lub

molach), która może przejść z fazy stałej do znanej objętości fazy ciekłej. Jest to proces termodynamiczny i zależy od czynników takich jak struktura chemiczna substancji rozpuszczanej oraz rozpuszczalnika, z których wynika ich wzajemne powinowactwo, a także od temperatury, ciśnienia, występowania wspólnego jonu, kompleksowania czy też siły jonowej [118,119,120].



Rys. 4. Schematyczne przedstawienie procesu rozpuszczania

Podczas rozpuszczania ciała stałego, w warunkach stacjonarnych (braku mechanicznego mieszania), przy jego powierzchni tworzy się roztwór nasycony. Na skutek procesu dyfuzji, następuje samorzutne mieszanie się (rozprzestrzenianie się) cząsteczek w obserwowanym układzie, wynikające z ich chaotycznych zderzeń, będących rezultatem ruchów cieplnych (ruchów Browna). Proces ten dąży do wyrównania się stężeń w całym ośrodku, co jest równoznaczne ze wzrostem entropii. Nieskorelowany ruch cząstek z daną szybkością jest proporcjonalny do siły napędowej (F), którą w tym przypadku jest gradient stężenia, natomiast współczynnikiem proporcjonalności jest tzw. ruchliwość cząstek (B) (Równania 1-2). Dyfuzja, a co za tym idzie również rozpuszczanie ciała stałego są ściśle zależne od potencjału chemicznego μ . Jest to wielkość termodynamiczna wynikająca z energii swobodnej. W układach wielofazowych rozpatrywana substancja przechodzi w sposób samorzutny z fazy o wyższym potencjale chemicznym do fazy, w którym potencjał jest niższy w celu wyrównania wartości potencjału μ_a we wszystkich fazach. Jest to zatem źródło siły napędowej, z której wynika powstanie gradientu stężeń. Na podstawie tych rozważań można sformułować pierwsze prawo dyfuzji Ficka, które określa związek pomiędzy ilością przepływających cząsteczek danej substancji w jednostce czasu przez prostopadłą do tego strumienia powierzchnię (strumieniem dyfundującej substancji) a gradientem jej stężenia. Jest ono stosowane do opisu procesów, w których strumień dyfuzji nie zmienia się w czasie. Skrócone wyprowadzenie tego prawa przedstawiają poniższe Równania 1-8 [121,122,123].

$$u = F \cdot B \quad (1)$$

$$F = -\frac{\delta\mu}{\delta x} \quad (2)$$

gdzie: u - szybkość cząstek; F - wartość siły napędowej; B - ruchliwość cząstek; μ - potencjał chemiczny; $\delta\mu/\delta x$ - gradient potencjału;

Dla dyfuzji w gradiencie potencjału chemicznego istnieje zależność:

$$j = u \cdot c \quad (3)$$

gdzie: j - strumień dyfuzji; c - stężenie substancji dyfundującej;

Zatem:

$$j = -c \cdot B \cdot \frac{\delta\mu}{\delta x} \quad (4)$$

$$\frac{\delta\mu}{\delta x} = \frac{k \cdot T}{c} \cdot \frac{\delta c}{\delta x} \quad (5)$$

gdzie: k - stała Boltzmana; T - temperatura; $\delta c/\delta x$ - gradient stężenia;

Po podstawieniu otrzymuje się:

$$B \cdot k \cdot T = D \quad (6)$$

$$j = -B \cdot k \cdot T \cdot \frac{\delta c}{\delta x} \quad (7)$$

gdzie: D - współczynnik dyfuzji;

Podsumowując, dla dyfuzji rozpatrywanej w przestrzeni jednowymiarowej otrzymujemy zależność będącą pierwszym prawem dyfuzji:

$$j = -D \frac{\delta c}{\delta x} \quad (8)$$

W bardziej skomplikowanym przypadku, gdy wartość strumienia dyfuzji nie jest stała w czasie (stężenie ulega zmianom w czasie), stosowane jest drugie prawo dyfuzji Ficka (Równanie 9) [124].

$$\frac{\delta c}{\delta t} = \frac{\delta}{\delta x} \cdot \left(D \frac{\delta c}{\delta x} \right) \quad (9)$$

gdzie: t - czas; x - odległość/pozycja;

Jeżeli współczynnik dyfuzji D nie zależy od położenia, można zastosować Równanie 10.

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \frac{\delta^2 c}{\delta x^2} \quad (10)$$

Zjawisko dyfuzji ma kluczowe znaczenie m.in. w procesach uwalniania leków i degradacji hydrolytycznej polimerów, a także w syntezie chemicznej. Jest również podstawą wielu procesów biologicznych zachodzących w komórkach organizmów żywych.

4.4.2. Teorie rozpuszczania

Intensywne badania dotyczące podstaw rozpuszczania ciał stałych, w tym leków, przypadają na koniec XIX i pierwszą połowę XX wieku. Do opisu mechanizmu rozpuszczania opracowano pewne ogólne modele, które w zależności od rozpatrywanego przypadku mogą występować samodzielnie lub jako kombinacja. Stanowią one narzędzie, pozwalające zarówno na obranie pewnej fizycznej podstawy przed zaprojektowaniem eksperymentu naukowego, oraz pomoc w interpretacji uzyskanych wyników doświadczalnych. Zostały one szczegółowo omówione w pracy przeglądowej Higuchiego z 1967r. i do dziś stanowią punkt odniesienia dla wielu badań dotyczących uwalniania leków [125,126,127].

4.4.2.1. Model warstwy dyfuzyjnej

W pierwotnej postaci, model ten został opisany już w 1904r. przez Nersta [128]. Jego głównym założeniem jest statyczność warstwy cieczy o pewnej grubości (H) w czasie, gdy ciecz porusza się do powierzchni z określoną prędkością. W jej obrębie rozpuszczanie jest natychmiastowe z wytworzeniem roztworu nasyconego. Wynika stąd, że szybkość procesu jest limitowana jedynie przez dyfuzję z wyszczególnionego obszaru stacjonarnej cieczy w kierunku całej jej objętości, zgodnie z pierwszym prawem Ficka. Po przejściu przez granicę oddaloną od powierzchni ciała stałego o wartość „H”, następuje natychmiastowe mieszanie. Proces ten przedstawiono na Rys. 5. Szybkość rozpuszczania ciała stałego na jednostkę powierzchni (G) dla grubości warstwy dyfuzyjnej (H) i współczynnika dyfuzji (D) dla rozpuszczanej substancji, można wyznaczyć stosując Równanie 11 [86].

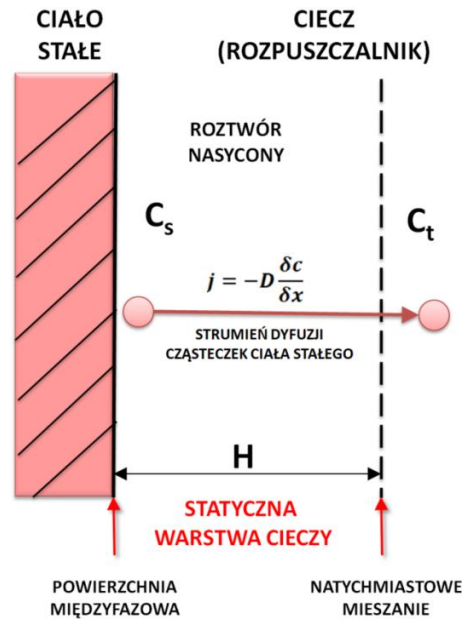
$$G = \frac{D}{H} (C_s - C_t) \quad (11)$$

W przypadku modelu warstwy dyfuzyjnej szybkość rozpuszczania jest proporcjonalna do pola powierzchni (S) ciała stałego, które według założenia pozostaje niezmiennie w czasie, oraz różnicy stężeń w warstwie statycznej (C_s) i ośrodku w danym czasie „t” (C_t). Tę zależność określa równanie Noyesa-Whitneya (Równanie 12), wyznaczone na podstawie badań dotyczących rozpuszczania substancji tj. kwas benzoesowy i chlorek rtęci [129]. Współczynnikiem proporcjonalności jest stała szybkości rozpuszczania (k), która zależy od współczynnika dyfuzji substancji rozpuszczanej (D), drogi dyfuzji, temperatury, mieszania, polimorfizmu ciała stałego a także zmian jego pola powierzchni oraz zmian lepkości ośrodka.

$$G = \frac{\delta C}{\delta t} = k \cdot S \cdot (C_s - C_t) \quad (12)$$

Jeżeli gradient stężenia substancji rozpuszczanej $\delta c / \delta x$ ma wartość stałą, przy niezmienniejącej się wartości stężeń w warstwie statycznej (C_s) i w objętości rozpuszczalnika (C_t) (w odległości od

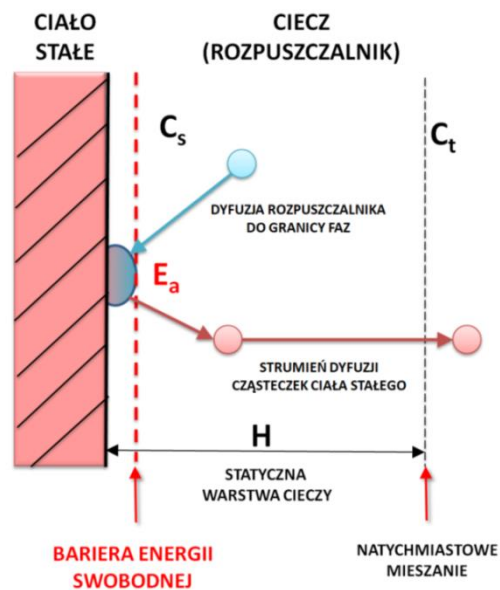
powierzchni większej niż „H”), przy czym C_s ma znacznie większą wartość niż C_t , to szybkość rozpuszczania jest stała.



Rys. 5. Schemat modelu warstwy dyfuzyjnej rozpuszczania ciała stałego

4.4.2.2. Model bariery międzyfazowej

Jest to model zakładający, że reakcja na granicy faz nie zachodzi w sposób natychmiastowy, ze względu na występowanie pewnej bariery aktywacji energii swobodnej, którą należy pokonać, aby doszło do rozpuszczania. Wartość energii aktywacji jest charakterystyczna dla danej powierzchni międzyfazowej [130]. Poza tym, mechanizm nie różni się od modelu warstwy dyfuzyjnej, z tym wyjątkiem, że etapem limitującym nie jest tu dyfuzja z warstwy statycznej, która zachodzi stosunkowo szybko, lecz pokonanie wspomnianej bariery energetycznej (Rys. 6) [86].



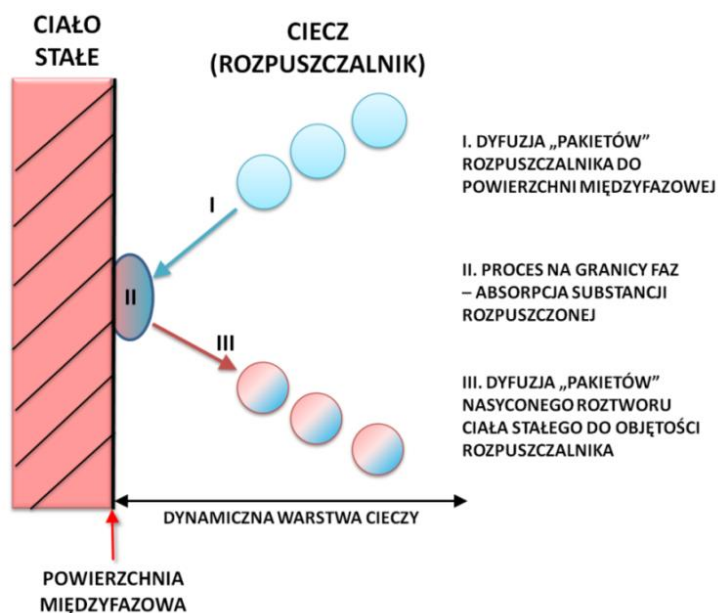
Rys. 6. Schemat modelu bariery międzyfazowej rozpuszczania ciała stałego

Ilościowo, szybkość rozpuszczania substancji (G) w przeliczeniu na jednostkę jej powierzchni jest proporcjonalna do różnicy stężeń w warstwie statycznej (C_s) i poza tą warstwą (C_t) a współczynnikiem proporcjonalności jest efektywna stała szybkości transportu międzyfazowego K_i (Równanie 13).

$$G = \frac{\delta C}{\delta t} = K_i(C_s - C_t) \quad (13)$$

4.4.2.3. Model Danckwerta

Jest to model opierający się o tzw. odnowę powierzchni. Zakłada, że makroskopowe „pakiety” rozpuszczalnika o pewnej objętości docierają do granicy międzyfazowej na drodze dyfuzji wirowej, gdzie absorbują pewną ilość substancji rozpuszczanej. Następnie dyfundują do otoczenia i jednocześnie są zastępowane nowymi „pakietami” rozpuszczalnika (Rys. 7). Proces ten zależy od transportu masy substancji rozpuszczonej (m) w czasie (t), a więc od szybkości rozpuszczania [131].



Rys. 7. Schemat modelu Danckwerta rozpuszczania ciała stałego

Model Danckwerta można przedstawić za pomocą Równania 14.

$$G = \frac{\delta C}{\delta t} = \frac{\delta m}{\delta t} = S \cdot (C_s - C_t) \cdot \sqrt{\gamma \cdot D} \quad (14)$$

gdzie: γ - szybkość odnowy powierzchni; m - masa rozpuszczonej substancji; D - współczynnik dyfuzji;

4.4.3. Osmoza i pęcznienie matrycy

Osmoza jest zjawiskiem związanym z transportem wody przez półprzepuszczalną membranę, w celu wyrównania potencjału chemicznego po obu jej stronach, który pojawia się ze względu na różnicę stężeń oraz kompatybilności osmolitu (substancji małocząsteczkowej lub polimeru) z wodą. Jest to proces stanowiący podstawę działania systemów zbiornikowych, w których kinetyka uwalniania

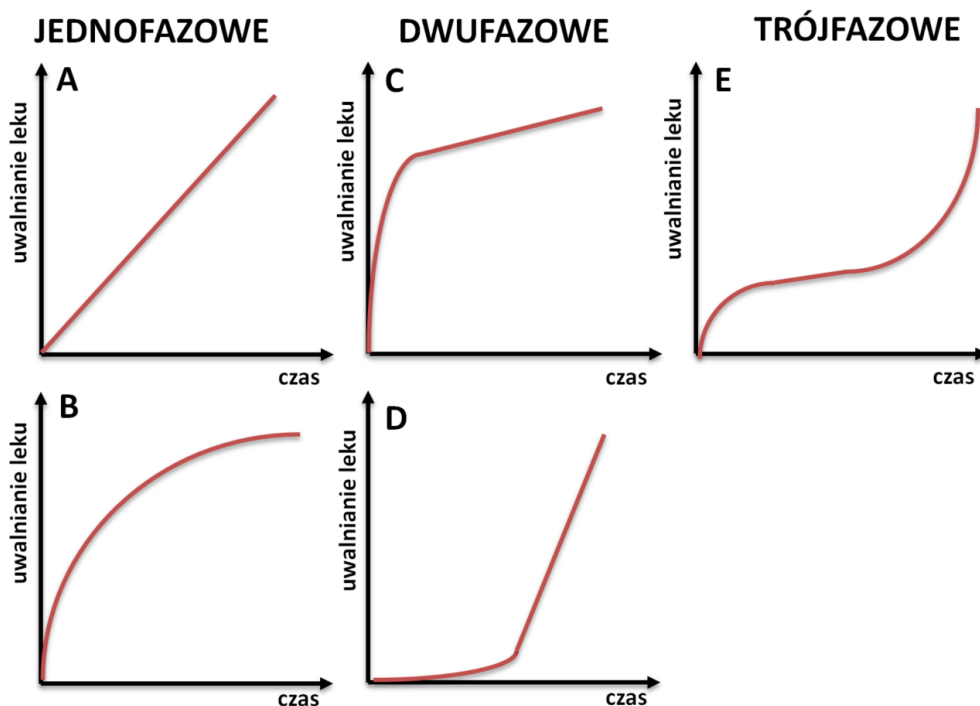
leków kontrolowana jest pompowaniem osmotycznym. Wartość strumienia przepływu osmotycznego zależy od takich czynników jak powinowactwo osmolitu do wody i jego stężenie, temperatura oraz parametry membrany tj. przepuszczalność i grubość. Woda przenikając przez membranę, wytwarza po jej drugiej stronie ciśnienie osmotyczne, które może spowodować wypychanie leku przez specjalne kanały umożliwiające jego dozowanie do otoczenia lub rozciągnięcie powłoki, która została uprzednio naniesiona na powierzchnię leku, aż do jej rozerwania. Zmieniając jej grubość, możliwe jest kontrolowanie czasu uwolnienia substancji o działaniu terapeutycznym [132].

Zjawisko pęcznienia jest procesem analogicznym do osmozy, który jest charakterystyczny dla matrycowych systemów uwalniania leków. Odnosi się on do wnikania wody do fazy amorficznej polimeru. Powoduje to rozplątanie łańcuchów, zmniejszenie gęstości i wzrost objętości materiału. Często jest etapem początkowym, towarzyszącym procesowi rozpuszczania polimeru, jednak w przypadku hydrofobowości, wysokiej masy molowej lub struktury usieciowanej, rozpuszczanie nie zachodzi pomimo napływu wody. Zmianie ulegają jednak właściwości materiału. Staje się on zazwyczaj o wiele bardziej elastyczny i mniej kruchy. Maleją również opory dyfuzyjne wewnątrz struktury polimeru, co znacznie ułatwia transport uprzednio wprowadzonego leku. Kiedy pęcznienie zachodzi szybko, to dyfuzja limituje kinetykę uwalniania, w przeciwnym zaś razie, to proces pęcznienia matrycy jest czynnikiem kontrolującym szybkość procesu. W tego typu systemach wykorzystywane są zazwyczaj polimery będące w stanie szklistym w temperaturze ciała ludzkiego, ze względu na to, że faza amorficzna poniżej temperatury zeszklenia polimeru stawia opór wnikającej wodzie, ale nie uniemożliwia całkowicie jej wnikania. W takich warunkach często obserwowane jest przesuwanie się tzw. frontu spęcznienia, stanowiącego granicę pomiędzy częścią nawodnioną materiału o większych rozmiarach i suchą, o wymiarach wyjściowych. Ilość wody w objętości polimeru, która została spenetrowana jest względnie stała, jednak maleje ona drastycznie w warstwie granicznej. Szybkość spęcznienia zależy od hydrofilowości, temperatury zeszklenia, rozmiaru domen krystalicznych, temperatury lub obecności wprowadzonych osmolitów, mających za zadanie „wciąganie” wody do matrycy. Proces może też być aktywowany czynnikami zewnętrznymi jak np. zmiana pH lub temperatury. Spęcznienie jest procesem o skomplikowanej dynamice, dodatkowo może zachodzić równocześnie z rozpuszczaniem matrycy polimerowej, co powoduje, że z tego typu systemów obserwowane są bardzo różne profile uwalniania leków [132].

4.5. Przebieg profili uwalniania leków z polimerowych systemów

Profil uwalniania leku, jest graficzną reprezentacją zależności jego ilości uwolnionej do otoczenia w funkcji czasu. Kształt wykresu zależy od tych samych czynników, z którymi powiązana jest szybkość uwalniania substancji leczniczej. Z tego względu bywa dość skomplikowany i często składa się z kilku etapów. Dlatego, trudno jest przewidzieć jego dokładny przebieg przed przeprowadzeniem eksperymentu badawczego. Należałoby uwzględnić wszystkie wymienione w Rozdziale 4.3. parametry, konstrukcję danego systemu oraz warunki uwalniania. Mając jednak do dyspozycji empirycznie wyznaczony profil uwalniania, możliwe jest określenie etapów i procesów limitujących szybkość emisji leku, porównując uzyskane dane z istniejącymi modelami matematycznymi. Profile można podzielić ze względu na liczbę etapów (faz) uwalniania, wyraźnie oddzielonych od siebie za

pomocą pewnych punktów zwrotnych, po przekroczeniu których w znaczący sposób zmienia się szybkość uwalniania leku. W większości przypadków polimerowych systemów opisanych w literaturze różni się profile jednofazowe, dwufazowe lub trójfazowe (Rys. 8).



Rys. 8. Podstawowe typy profili uwalniania leków z polimerowych biodegradowalnych matryc

W przypadku uzyskania profilu jednofazowego uzyskuje się informację o tym, że lek uwalniany jest ze stałą szybkością w czasie, niezależną od jego stężenia, zgodną z kinetyką uwalniania zerowego rzędu. Jego reprezentację matematyczną stanowi funkcja liniowa [133]. Drugą możliwością jest uwalnianie coraz wolniej zachodzące w czasie, w zależności od zmian stężenia substancji aktywnej w matrycy. Taki profil jest zgodny z kinetyką uwalniania pierwszego rzędu, której reprezentacją matematyczną jest funkcja logarymiczna [134]. Profile dwufazowe składają się z etapu szybkiej emisji dużej dawki leku w relatywnie krótkim czasie (stosunku do całkowitego czasu uwalniania), po lub przed którym istnieje okres o znacznie wolniejszym uwalnianiu. W pierwszym przypadku po gwałtownym uwolnieniu leku nieosłoniętego przez matrycę, kontrolowanym szybkością jego rozpuszczania, następuje etap zależny od szybkości dyfuzji przez matrycę w czasie jej degradacji. W drugim przypadku, po okresie inhibicji spowodowanej np. rozpuszczaniem lub degradacją zabezpieczającej powłoki, lek uwalnia się ze znacznie większą szybkością [135,136]. W profilu trójfazowym, po etapie szybkiego uwalniania leku następuje spowolnienie procesu, kontrolowane przez dyfuzję. Następnie uwalnianie ponownie przyspiesza na skutek zaawansowanej degradacji i erozji matrycy (powstawanie pęknięć i porów). Czasami w drugiej fazie obserwuje się bardzo powolne uwalnianie, lub nawet jego chwilowe wstrzymanie. Może to sugerować, że polimer ma wysoki stopień krystaliczności, małą porowatość lub/i w układzie występują oddziaływania międzycząsteczkowe polimer-lek lub lek-lek [137,138].

Częstym zjawiskiem obserwowanym w czasie uwalniania leku, jest tzw. wyrzut początkowy (*ang. burst release*). Polega ono na gwałtownej emisji substancji terapeutycznej zaraz po umieszczeniu systemu w medium, po czym szybkość procesu znacznie spada. Efekt ten zazwyczaj trwa krótko i najczęściej dotyczy uwalniania leków łatwo rozpuszczalnych w wodzie lub stosowania hydrofilowych matryc o dużej powierzchni właściwej. W pewnych przypadkach jest to zjawisko niepożądane, ponieważ trudno jest kontrolować zarówno czas jego trwania oraz dawkę substancji czynnej. Może to prowadzić do toksyczności i wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych, ze względu na przekroczenie wartości stężenia terapeutycznego w tkance. Ma to kluczowe znaczenie w przypadku leczenia opierającego się np. na lekach o działaniu cytostatycznym. Jednak, w nielicznych przypadkach wyrzut początkowy może też dać korzystne efekty np. podczas leczenia ran, gdy wskazane jest szybkie osiągnięcie wysokiego stężenia substancji terapeutycznej w tkance lub podczas uwalniania pulsacyjnego. Przyczyny gwałtownego uwolnienia leku mogą wynikać z jego dyfuzji do powierzchni zewnętrznej systemu, podczas procesu jego otrzymywania lub w czasie nieprawidłowego lub zbyt długiego przechowywania. Omawiane zjawisko występuje częściej w przypadku matryc porowatych lub zawierających sporo defektów powierzchni w postaci pęknięć, a także wtedy, gdy uwalniany jest dobrze rozpuszczalny lek. Istnieje jednak kilka sposobów na ograniczenie wyrzutu początkowego leku. Najprostszymi sposobami są: zastosowanie powłoki zabezpieczającej lub polimeru o wyższej masie molowej. Można również niejednorodnie zdyspergować lek w matrycy – mniej przy jej powierzchni, lub obniżyć jej hydrofilowość za pomocą substancji pomocniczych lub zmiany składu chemicznego matrycy, co powinno spowolnić wnikanie wody [139].

4.6. Modele matematyczne uwalniania leków

Główną funkcją systemów kontrolowanego uwalniania jest zapewnienie stałego stężenia terapeutycznego leku podczas leczenia. Wiąże się to z uzyskaniem pożądanego profilu uwalniania. Aby osiągnąć zamierzony cel, konieczna jest znajomość mechanizmów związanych z transportem masy w obrębie badanego układu zawierającego substancję aktywną, oraz możliwość ilościowego przewidywania kinetyki jej uwalniania, już na etapie planowania opracowania systemu. Stosując pewne założenia, dotyczące właściwości leku, jego dystrybucji w danej formie nośnika, geometrii oraz materiału matrycy, w wielu przypadkach możliwe jest uzyskanie równania matematycznego, pozwalającego na charakterystykę kinetyki uwalniania substancji terapeutycznej, w formie funkcji zależności szybkości uwalniania od czasu. Uzyskany model, stanowi matematyczną reprezentację fizycznych procesów i zjawisk związanych z rozpuszczaniem i transportem masy substancji leczniczej, zmianami lub brakiem zmian, jakie zachodzą w obrębie nośnika, a także warunków otoczenia. Jest to więc użyteczne narzędzie pozwalające na szacowanie wyników eksperymentalnych, a także ich ewaluację. Przyspiesza to etap badawczo-rozwojowych dotyczących otrzymywania nowych form dawkowania leku [140]. W literaturze można znaleźć znaczną ilość opisanych modeli kontrolowanego uwalniania leków z różnego rodzaju formułacji. Z reguły mają one pewne ściśle założenia limitujące ich uniwersalność, ponieważ nie obejmują wszystkich, niejednokrotnie powiązanych ze sobą zmiennych, które wpływają na kinetykę procesu. Najczęściej stanowią pewne uproszczenia, które w celu

uzyskania dokładniejszych wyników mogą ulegać rozwojowi. Za prosty przykład niech posłużą modele zaproponowane przez Higuchiego w latach 60-tych, które zakładały, że uwalnianie zachodzi z materiałów płaskich o litej strukturze. Późniejszym rozwinięciem tej koncepcji było uwzględnienie porowatości nośnika [141]. Modele matematyczne dają jedynie możliwość szacowania wyników, ponieważ kompleksowa analiza wszystkich czynników wpływających na proces uwalniania jest w większości rzeczywistych przypadków bardzo skomplikowana. Niemniej jednak metody pozwalające na ilościowe określanie uwolnionej dawki leku, jak i przewidywanie mechanizmów, które są odpowiedzialne za ten proces ewoluują wraz z rozwojem systemów kontrolowanego uwalniania. Pozwala to na skrócenie czasu optymalizacji postaci leku pod kątem określonego zastosowania, a przez to obniża koszty [142].

Modele matematyczne można opracować stosując różne podejścia. Empiryczne oraz pół empiryczne są najprostsze, jednak nie uwzględniają wszystkich zjawisk i procesów towarzyszących uwalnianiu leku. Są za to ograniczone pewnymi założeniami, dlatego zdolność szacowania ilości uwolnionego środka aktywnego jest stosunkowo niska. Sprawdzają się jednak w przypadku porównywania profili uwalniania. Podejście mechanistyczne opiera się ściśle na analizie zjawisk fizycznych zachodzących w czasie uwalniania leku, a także uwzględnia geometrię i rozmiary nośnika. Wynika z praw dyfuzji. Modele numeryczne, są stosowane ze względu na skomplikowaną naturę procesu uwalniania leku. Dają one najdokładniejsze rezultaty, jednak wiąże się to z dużym stopniem ich skomplikowania. Podsumowując, można stwierdzić, że każde podejście charakteryzuje się pewnymi założeniami oraz ograniczeniami, które należy wziąć pod uwagę zarówno projektując system kontrolowanego uwalniania leku, jak i analizując uzyskane dane doświadczalne. Ich zastosowanie w pracach badawczych nie stało się póki co standardem w ewaluacji uzyskanych wyników. Niemniej jednak, ze względu na coraz powszechniejsze wykorzystanie technik komputerowych, modelowanie procesu uwalniania leków zyskuje coraz większą popularność. Dane statystyczne uzyskane przy użyciu silnika wyszukiwania *Academia.edu* wskazują, że na rok 2021 jedynie 21,4±2,3% publikacji naukowych dotyczących „dostarczania leków”, „systemów kontrolowanego uwalniania” oraz „nośników leków” zawiera w swojej treści odniesienie do modeli matematycznych [143, 144]. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę kilku z nich, mających najbardziej powszechne zastosowanie.

4.6.1. Model kinetyki uwalniania zerowego rzędu

Model kinetyki uwalniania zerowego rzędu stanowi wyidealizowany przypadek dostarczania leku do organizmu, zapewniający jego stałe stężenie otrzymywane w czasie, co ma szczególne znaczenie w przypadku terapii wykorzystującej antybiotyki, leki nasercowe, na ciśnienie, przeciwbólowe czy też antydepresanty. Model zakłada, że szybkość uwalniania nie zależy od początkowego stężenia leku a ilość uwolnionej substancji terapeutycznej rośnie liniowo w czasie (Równanie 15), co wiąże się z emisją równych dawek [145]. Przykład stanowi uwalnianie polifenoli z folii PEG opisanych przez Zhao *et al.*, tymololu z żelu indukowanego pH formowanego *in situ* z emulsji zawierającej poli(kwas akrylowy) przedstawionego w pracy Vijaya Rani *et al.* oraz uwalnianie opioidów z prętów PLGA opublikowane przez Sendila *et al.* [146,147,148].

$$Q = Q_0 + k_0 \cdot t \quad (15)$$

gdzie: Q - ilość uwolnionego leku; Q_0 - początkowa ilość leku w otoczeniu (zwykle 0); k_0 - stała szybkości uwalniania zerowego rzędu; t - czas;

4.6.2. Model kinetyki uwalniania pierwszego rzędu

Model kinetyki uwalniania pierwszego rzędu po raz pierwszy został zastosowany do opisu rozpuszczania leków przez Gibaldi'ego i Feldmana w 1967 roku [149]. W odniesieniu do procesu uwalniania leku zakłada zależność szybkości uwalniania od różnicy stężeń pomiędzy warstwą statyczną cieczy przy powierzchni ciała stałego a objętością cieczy (gradient stężenia $C_0 - C_t$). W tym przypadku założono, że pole powierzchni nie ulega zmianie na skutek procesu rozpuszczania, zaś szybkość uwalniania maleje w czasie i można ją wyrazić na dwa sposoby (Równanie 16 i Równanie 17) [150]. W ten sposób m.in. leki rozpuszczalne w wodzie uwalniają się z nierozpuszczalnych i niepęczniejących porowatych matryc na skutek zwiększenia drogi dyfuzji cząsteczek. Przykład stanowi praca Mulye *et al.*, w której opisano zgodne z kinetyką pierwszego rzędu uwalnianie maleinianu chlorfeniraminu z matryc w postaci sprasowanych tabletek, sporządzonych z dwuwodnego fosforanu wapnia z dodatkiem stearynianu magnezu, oraz badania przeprowadzone przez Soni i Yadava dotyczące uwalniania etopozylu z hydrożeli polimerowych [134,151].

$$\frac{\delta c}{\delta t} = -k \cdot t \quad (16)$$

$$\log C_t = \log C_0 - \frac{kt}{2,303} \quad (17)$$

gdzie: C_0 – stężenie leku w warstwie statycznej przy powierzchni ciała stałego; k - stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu;

4.6.3. Model Higuchiego

Model Higuchiego był pierwszym opracowanym modelem, mającym zastosowanie w przypadku uwalniania dobrze i słabo rozpuszczalnych leków ze stałych oraz półstałych matryc. Początkowo opisywał rozpuszczanie środków terapeutycznych wprowadzonych w postaci suspensji do maści. Później został rozszerzony o inne postaci układów tj. płaskie i lite (Równanie 18) oraz geometryczne i porowate (Równanie 19). Opiera się on na kilku założeniach. Pierwszym z nich jest początkowe stężenie leku w matrycy, które znacznie przekracza jego rozpuszczalność. Kolejnym założeniem jest dyfuzja cząsteczek leku odbywająca się tylko w jednym wymiarze, a cząstki leku są znacznie mniejsze niż grubość systemu. Przyjmuje również, że pęcznienie i rozpuszczanie matrycy nie odgrywają istotnej roli, a dyfuzyjność leku nie ulega zmianom [152,153].

$$f_t = Q = A\sqrt{D(2C_0 - S)S \cdot t} \quad (18)$$

gdzie: Q - ilość leku uwolnionego w czasie t na jednostkę powierzchni A; C_0 - początkowe stężenie leku; S - rozpuszczalność leku; D - współczynnik dyfuzji leku w matrycy;

W przypadku, gdy stężenie leku w matrycy jest niższe niż rozpuszczalność, a uwalnianie odbywa się przez pory, zachodzi zależność:

$$f_t = Q = \sqrt{\frac{Dp}{\tau}(2C_0 - pS)S \cdot t} \quad (19)$$

gdzie: p - porowatość; τ - krętość porów matrycy;

Istnieje również uproszczony model Higuchiego, dla uwalniania leku z nierozpuszczalnej matrycy, bazujący na równaniu dyfuzji Ficka (Równanie 20).

$$f_t = Q = k_H \sqrt{t} \quad (20)$$

gdzie: k_H - stała rozpuszczania Higuchiego;

Zależności Higuchiego można zastosować np. do niektórych systemów transdermalnych, tabletek matrycowych, czy też maści w postaci cienkiego filmu. Przykładem jest praca Gouda *et al.*, w której opisano uwalnianie leków stosowanych w chorobie Parkinsona (karbidoba oraz lewodopa) z otrzymanych metodą granulacji na mokro tabletek, gdzie matrycę stanowiła mieszanina hydroksypropylometylocelulozy oraz hydroksypropylcelulozy. Zaobserwowano w niej zgodność kinetyki uwalniania z modelem Higuchiego, kontrolowanego dyfuzyjnie [150]. Innym przykładem jest opisane przez Costę *et al.* uwalnianie estradiolu z dostępnych komercyjnie systemów transdermalnych. Po przeanalizowaniu profili uwalniania uzyskanych *in vitro* i próbie dopasowania kilku modeli kinetycznych, stwierdzono, że aż 10 z 13 zbadanych systemów było zgodnych z modelem uwalniania Higuchiego [154].

4.6.4. Model Hixona-Corwella

Model pierwiastka sześciennego Hixsona-Corwella opisuje proces uwalniania z systemu, którego pole powierzchni oraz wymiary ulegają zmianie, jednak zachowana zostaje jego forma geometryczna. Wykorzystano tu obserwację, że powierzchnia ciała stałego jest proporcjonalna do pierwiastka sześciennego jego objętości. Model zakłada intensywne mieszanie w badanym ośrodku, dlatego etapem limitującym szybkość uwalniania jest rozpuszczanie leku. Jeżeli nie zostały osiągnięte warunki równowagowe, a kształt systemu zmniejsza się proporcjonalnie w czasie to Równanie 21 powinno dać linię prostą [155].

$$\sqrt[3]{W_t} = \sqrt[3]{W_0} - k_{HC} \cdot t \quad (21)$$

gdzie: W_t - ilość leku pozostała w farmaceutycznej formie dozowania; W_0 - początkowa ilość leku; k_{HC} - stała szybkości Hixsona-Corwella uwzględniająca zależność powierzchni od objętości;

Kinetykę uwalniania zgodną z modelem Hixsona-Corwella uzyskuje się dla farmaceutycznej postaci leku w formie tabletki lub peletki, gdzie rozpuszczanie zachodzi równomiernie i proporcjonalnie w płaszczyznach równoległych do powierzchni. Przykładowo, taki sposób uwalniania opisano w publikacji Chena *et al.*, dotyczącej badania kinetyki uwalniania chlorowodorku diltiazemu z

wielowarstwowych peletek składających się od środka do powierzchni zewnętrznej z warstwy nośnej, warstwy leku, warstwy pęczniającej, do której wprowadzono niejonowy surfaktant Tween 20 oraz warstwy kontrolującej uwalnianie. Zaobserwowano dominację mechanizmu erozyjnego, szybkość uwalniania zaś, była niezależna od zmiany pH oraz warunków hydrodynamicznych i malała wraz ze wzrostem ciśnienia osmotycznego ośrodka. Stwierdzono, że siłą napędową procesu był gradient ciśnienia osmotycznego, co przełożyło się na kinetykę uwalniania odpowiadającą modelowi Hixsona-Corwella [156].

4.6.5. Model Korsmeyera-Peppasa

Model Korsmeyera-Peppasa pozwala określić mechanizm transportu i uwalniania leku z polimerowych matryc, na podstawie dopasowania danych empirycznych do Równania 22. Założeniem, jest cylindryczny kształt rozpatrywanego systemu. Model uwzględnia wiele zjawisk zachodzących równocześnie w obrębie badanego układu, tj. dyfuzja wody do wewnątrz, pęcznienie, formowanie żelu, transport leku do otoczenia (zarówno zgodny z prawami dyfuzji, jak i anomalny – niespełniający ich), czy też rozpuszczanie matrycy. Dopasowując dane empiryczne (pierwsze 60% wyników dotyczących uwalniania leku), można obliczyć wartość współczynnika uwalniania „n”, który determinuje jak wygląda w danym przypadku zależność szybkości uwalniania od czasu, a tym samym pozwala określić mechanizm procesu (Tabela 6) [157].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (22)$$

gdzie: M_t/M_∞ - frakcja leku uwolniona w czasie t ; k - stała szybkości uwalniania; n - współczynnik uwalniania;

Tabela 6. Mechanizmy uwalniania leku w zależności od wartości obliczonego współczynnika uwalniania (n)

Współczynnik uwalniania	Zależność $f(t)$	Mechanizm uwalniania leku
$n < 0,50$	t^n	Wolna dyfuzja zgodna z prawem Ficka, z niepęczniającej matrycy
$n = 0,50$	\sqrt{t}	Dyfuzja zgodna z prawem Ficka, z niepęczniającej matrycy
$0,50 < n < 1,00$	t^{n-1}	Dyfuzja anomalna, niezgodna z prawem Ficka / erozja
$n = 1,00$	Nie zależy od czasu	Kinetyka zerowego rzędu / pęcznienie polimeru
$n > 1,00$	t^{n-1}	Relaksacja / erozja matrycy

W przypadku, gdy możliwe jest wystąpienie efektu wyrzutu początkowego leku (b), Równanie 22 przyjmuje poniższą formę (Równanie 23) [158].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n + b \quad (23)$$

Aby uwzględnić opóźnienie uwalniania „ l ”, stosuje się Równanie 24, zaproponowane przez Forda *et al.* w pracy dotyczącej uwalniania chlorowodorku prometazyny z matrycowego systemu w postaci tabletki, gdzie nośnikiem była hydroksypropylometyloceluloza [159].

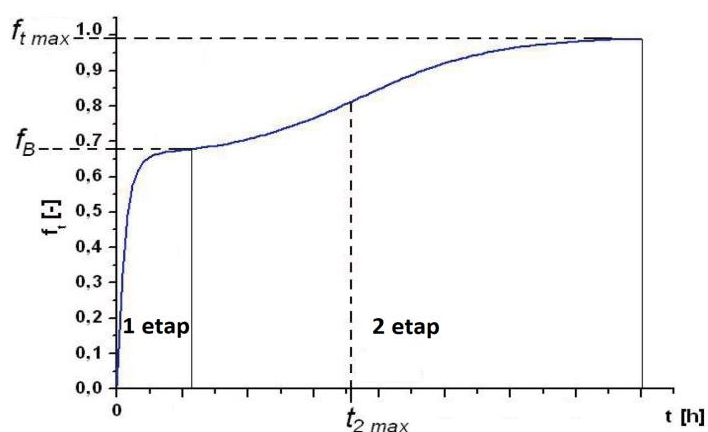
$$\frac{M_t}{M_\infty} = [k \cdot (t - 1)^n + k' \cdot (t - 1)^{2n}] \quad (24)$$

gdzie: k - stała szybkości uwalniania kontrolowanego dyfuzyjnie; k' - stała szybkości uwalniania kontrolowanego erozyjnie;

Przykład wykorzystania modelu Korsmeyera-Peppasa stanowi praca Permandewi *et al.*, w której korzystając z danych doświadczalnych uzyskanych przez dwie inne grupy badawcze, przeanalizowano kinetykę uwalniania furosemidu enkapsulowanego w warstwowej matrycy wytworzonej z warstw polijonów oraz żelatyny, a także uwalnianie chlorofiliny sodowo-żelazowej z nośnika etylocelulozowego. Najlepsze dopasowanie wyników eksperymentalnych uzyskano dla modelu Korsmeyera-Peppasa, a obliczone wartości współczynnika „ n ” wskazywały na dyfuzyjny charakter uwalniania w przypadku obu leków [160].

4.6.6. Model Gallaghera-Corrigana

Model Gallaghera-Corrigana określa ilość leku uwalnianą z biodegradowalnej matrycy polimerowej. Zakłada, że proces zachodzi, jako rezultat kombinacji dyfuzji i erozji nośnika, co daje sigmoidalny profil uwalniania (Rys. 9). Model uwzględnia wyrzut początkowy frakcji leku niechronionego przez matrycę, po którym następuje powolne uwalnianie kontrolowane przez szybkość degradacji, co odzwierciedla dwumodułowe Równanie 25. Autorzy modelu zaproponowali tego typu rozwiązanie w swojej pracy z 2000r. dotyczącej uwalniania chlorowodoru lewamizolu z biodegradowalnej polimerowej matrycy z kopolimeru poli(D,L-laktyd-co-glikolid) (50:50% mol). Otrzymano systemy uwalniania w formie dysków, które przygotowano wylewając folie z roztworu polimeru zawierającego zawiesinę leku, a po odparowaniu rozpuszczalnika sprasowano. Profile uwalniania pomyślnie opisano łącząc składową odpowiadającą kinetyce pierwszego rzędu dla początkowej fazy uwalniania oraz część odpowiadającą uwalnianiu kontrolowanemu przez degradację matrycy [161]. Innym przykładem jest praca Gozalez *et al.*, w której przeprowadzono uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych z żelu otrzymanego z alginianu wapnia. Również w tym przypadku otrzymano dwuetapowy, sigmoidalny profil uwalniania, który dobrze opisywał model Gallaghera-Corrigana [162].



Rys. 9. Profil uwalniania leku charakterystyczny dla modelu Gallaghera-Corrigana [163]

$$f_t = f_{t \max} (1 - e^{-k_1 \cdot t}) + (f_{t \max} - f_b) \cdot \left[\frac{e^{k_2 \cdot t - k_2 \cdot t_{2 \max}}}{1 + e^{k_2 \cdot t - k_2 \cdot t_{2 \max}}} \right] \quad (25)$$

gdzie: f_t - frakcja leku uwolniona w czasie t ; $f_{t \max}$ - maksymalna ilość leku uwolniona w procesie; f_b - frakcja leku uwolniona podczas wyrzutu początkowego; k_1 - stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu (etap pierwszy uwalniania – wyrzut początkowy); k_2 - stała szybkości uwalniania w etapie kontrolowanym szybkością degradacji; $t_{2 \max}$ - czas do ustalenia maksymalnej szybkości uwalniania w etapie 2;

4.6.7. Model Hopfenberga

Model Hopfenberga pozwala na porównywanie uwalniania leków z polimerowych matryc w formie płytek, sfer oraz cylindrów o nieskończonej długości, charakteryzujących się erozją powierzchniową, która jest tu czynnikiem limitującym. Równanie 26 posiada fizyczny sens dopóki pole powierzchni systemu pozostaje stałe w czasie degradacji [164]. Tego typu systemy kontrolowanego uwalniania leków opisał Katzhendler *et al.* w pracy, gdzie badano szybkość uwalniania trihydratu amoksyliny z erodujących powierzchniowo tabletek, o matrycy wykonanej z mieszaniny hydroksyproplylometylocelulozy i poli(glikolu etylenowego) [165].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 \cdot t}{C_0 \cdot a} \right]^n \quad (26)$$

gdzie: k_0 - stała szybkości stopnia erozji; C_0 - początkowa ilość leku w systemie; a - połowa wartości grubości systemu uwalniania (również promień sfery lub walca); n - współczynnik geometryczny ($n=1$ (płaska), 2 (cylindryczna), 3 (sferyczna));

W przypadku, gdy istotne jest uwzględnienie czasu opóźnienia uwalniania (t_L) należy uwzględnić poprawkę powyższego równania (Równanie 27).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 \cdot t (t - t_L)}{C_0 \cdot a} \right]^n \quad (27)$$

4.6.8. Pozostałe modele i sposoby analizy kinetyki uwalniania leków

Na przestrzeni lat opracowano również inne modele opisujące mechanizmy oraz kinetykę uwalniania leków z różnego rodzaju systemów. Na potrzeby niniejszej pracy nie zostały one jednak szczegółowo opisane. W celach poglądowych na omawiany temat, zostały zebrane i krótko scharakteryzowane w Tabeli 7.

Tabela 7. Zestawienie pozostałych modeli i sposobów analizy kinetyki uwalniania leków

Model	Opis
Model Ficka [166]	<ul style="list-style-type: none"> - Uwalnianie kontrolowane jedynie przez dyfuzję. - Szybkość dyfuzji nie ulega zmianom w czasie. - Stosowalny jedynie do prostych systemów uwalniania, w postaci rezerwuarów otoczonych jednorodną membraną polimerową o stałej przepuszczalności.
Model Kitazawy [167]	<ul style="list-style-type: none"> - Opisuje wpływ twardości, czasu rozpadu i szybkości rozpuszczania na uwalnianie leku z niepowlekanych tabletek.
Model Weibulla [168]	<ul style="list-style-type: none"> - Uwzględnia różne procesy związane z rozpuszczaniem, pozwalając na określenie ilości leku, która została uwolniona do otaczającego środowiska w funkcji czasu (w skończonym czasie). - Nie zależy od równoczesnego efektu różnych zjawisk zachodzących podczas uwalniania leku.
Model Bakera-Lonsdale'a [169]	<ul style="list-style-type: none"> - Jest rozwojowym wariantem modelu Higuchiego, opracowanym dla opisu uwalniania leku ze sferycznych matryc. - Ma zastosowanie do linearyzacji danych z eksperymentów uwalniania.
Model Gomperta [170]	<ul style="list-style-type: none"> - Charakteryzuje go stromy wzrost przebiegu funkcji w początkowej fazie, po której następuje powolne, asymptotyczne zbieganie się do maksymalnej wartości rozpuszczania. - Użyteczny do porównywania profili uwalniania leków o dobrej rozpuszczalności oraz średniej szybkości uwalniania.
Model Cooney'a [171]	<ul style="list-style-type: none"> - Opisuje systemy uwalniania leków w postaci sferycznej oraz cylindrycznej, ulegające erozji powierzchniowej, która jest czynnikiem limitującym szybkość emisji substancji terapeutycznej. - Szybkość uwalniania jest proporcjonalna do pola powierzchni systemu, która ulega zmianom w czasie.
Modele oparte o analizę regresji [172,173]	<ul style="list-style-type: none"> - Analizę regresji stosuje się w celu optymalizacji formulacji, dla której uzyskano dane eksperymentalne dotyczące uwalniania in vivo. - Dla układów liniowych stosuje się model regresji pierwszego rzędu. - Model regresji drugiego rzędu stosuje się do linearyzacji układu kwadratowego. - W celu uzyskania bardziej dokładnej regresji stosuje się metody nieliniowe.
Modele oparte o symulacje komputerowe [174,175,176]	<ul style="list-style-type: none"> - Symulacje Monte Carlo. - Otrzymane przy użyciu sztucznych sieci neuronowych. - Otrzymane z wykorzystaniem algorytmów sztucznej inteligencji oraz uczenia maszynowego. - Są to zaawansowane techniki komputerowe, pozwalające na optymalizację systemów uwalniania leków.

5. Degradacja polimerów biodegradowalnych

Kryterium, według którego można określić czy dany polimer należy do materiałów biodegradowalnych lub też nieulegających biodegradacji, jest zależność pomiędzy czasem jego rozkładu, a czasem, w którym pełni on określoną funkcję [177]. Z reguły, polimery biodegradowalne tracą swoje właściwości w trakcie aplikacji lub szybko po jej zakończeniu. Przykładem mogą być np. rusztowania komórkowe, które spełniają swoją rolę najlepiej, gdy tempo ich rozkładu jest dostosowane do tempa proliferacji danego typu komórek. Polimer traci więc swoje cechy w trakcie użytkowania, a po spełnieniu założonego celu – w tym przypadku regeneracji danej tkanki, zostaje całkowicie zresorbowany przez organizm [178,179]. Innym przykładem mogą być implanty biomedyczne np. w postaci biodegradowalnych stentów naczyniowych pokrytych lekiem. Po zaimplantowaniu spełniają one dwie funkcje – uwalniają substancję aktywną przeciwdziałającą tworzeniu się płytki miażdżycowej oraz mechanicznie podtrzymują ściany tętnicy w celu utrzymania prawidłowego przepływu krwi. Spełniwszy swoją rolę, stent ulega wbudowaniu w ścianę tętnicy, gdzie następuje jego dalsza degradacja i resorpcja. Na tym etapie jego właściwości mechaniczne nie pozwalają na podtrzymywanie przekroju światła naczynia krwionośnego, jednak przez pewien czas (do kilku miesięcy) pewne ilości polimeru są obecne w tkance [180,181].

Polimery uznawane za nieulegające biodegradacji, w odróżnieniu od biodegradowalnych, po spełnieniu swojej funkcji pozostają w niemal niezmienionej formie przez bardzo długi czas. Najczęściej nie posiadają w strukturze łańcucha niskoenergetycznych wiązań chemicznych, łatwo ulegających rozpadowi. Często wykazują także właściwości hydrofobowe oraz strukturę krystaliczną, co zapewnia dodatkową ochronę przed czynnikami takimi jak woda lub działanie mikroorganizmów [182]. Niemniej jednak, reakcje rozkładu zachodzą w tego typu materiałach, przy czym, jest to bardzo powolny proces. W zależności od zastosowanych dodatków, degradacja tworzyw konstrukcyjnych może trwać od kilku do ponad tysiąca lat [183]. Stabilność ich właściwości w czasie, jest jednocześnie wadą i zaletą, ponieważ umożliwia to ogromną liczbę zastosowań, ale również stanowi duży problem z punktu widzenia ekologii. Generowanie przez współczesne społeczeństwo olbrzymiej ilości odpadów z tworzyw sztucznych, wymaga kosztownego i czasochłonnego recyklingu [184, 185]. Jednak zmiana w mentalnym podejściu do tego problemu jest coraz wyraźniej widoczna w ostatnich latach, co przejawia się zarówno w chęci dbania o środowisko naturalne oraz oszczędzania surowców. Skutkiem tego, jest opracowywanie technologii produkcji wykorzystujących różnego rodzaju recyklaty i odpady z tworzyw polimerowych, przygotowywanie kompozycji o przyspieszonym czasie degradacji, a także coraz powszechniejsza wśród społeczeństwa segregacja odpadów [186].

Pojęcie degradacji, w przypadku polimerów określa proces rozerwania łańcucha z wytworzeniem kolejno frakcji oligomerów a następnie monomerów. Jest to spowodowane działaniem określonych czynników zewnętrznych takich jak woda (hydroliza), utlenianie, promieniowanie elektromagnetyczne (tj. UV, gamma), temperatura czy też siły mechaniczne, na odpowiednie wiązania chemiczne obecne w cząsteczce [187]. Skutkuje to rozerwaniem łańcuchów polimerowych, czego rezultatem jest zmniejszenie się ich masy molowej w czasie oraz zmiana właściwości fizykochemicznych. Z punktu widzenia polimerów biodegradowalnych, najważniejszymi czynnikami są te, które są związane ze

środowiskiem naturalnym. Chodzi tu głównie o obecność wody, mikroorganizmów oraz promieniowania UV.

5.1. *Degradacja hydrolityczna poliestrów biodegradowalnych*

W przypadku biodegradowalnych poliestrów alifatycznych takich jak PLA, PGA, PCL oraz kopolimerów, ze względu na możliwość ich stosowania w kontakcie z tkankami oraz płynami fizjologicznymi, najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za degradację, rozpatrywanym w dalszej części niniejszej pracy jest woda, powodująca hydrolizę wiązań estrowych obecnych w łańcuchach poliestrowych. Reakcja ta może zachodzić pasywnie, gdy woda jest jedynym oddziaływującym czynnikiem lub aktywnie, gdy jest katalizowana enzymami obecnymi w płynach ustrojowych [188,189,190]. Czynniki wpływające na jej kinetykę można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej z nich należą właściwości polimeru – jego powinowactwo do środowiska degradacji (hydrofilowość wynikająca ze struktury chemicznej, a w przypadku kopolimerów – ze składu molowego), krystaliczność, temperatura zeszklenia, zdolność do absorbowania wody oraz średnia masa molowa. Drugą grupę stanowią czynniki środowiskowe i technologiczne tj. mieszanie medium, temperatura, pH czy siła jonowa a także metoda wytworzenia próbki, obecność dodatków (np. leków, plastyfikatorów, napelnaczy itp.), obróbka po przetwórstwie (np. wygrzewanie) oraz jej kształt i wymiary [191, 192, 193, 194, 195, 196]. Generalnie można zauważyć, że polimery hydrofobowe i krystaliczne, w warunkach degradacji znajdujące się w stanie szklistym degradują wolniej niż hydrofilowe i amorficzne, będące w stanie lepkosprężystym. W przypadku polimerowych systemów kontrolowanego uwalniania leków zaobserwowano, że hydrofilowe substancje terapeutyczne, na skutek szybkiego wypłukiwania się z matrycy powodują powstawanie porów, co przyspiesza degradację. W przypadku uwalniania hydrofobowych leków sytuacja jest odwrotna. Utrudniają one wnikanie wody w głąb polimeru, przez co spowalniają jego hydrolizę. Ponadto, substancje czynne posiadające w swojej strukturze grupy funkcyjne o charakterze kwasowym, powodują przyspieszenie degradacji na skutek katalizy, zasadowe zaś neutralizują kwaśne produkty degradacji polimerów takich jak PLA czy PGA, jednocześnie wywołując hydrolizę zasadową [197,198,199, 200].

Alifatyczne poliestry biodegradowalne dość łatwo ulegają procesowi degradacji hydrolitycznej. Przebiega ona w czterech etapach. Pierwszym z nich jest dyfuzja wody do matrycy, po której zachodzi hydroliza wiązań estrowych i powstanie kwaśnych produktów degradacji w postaci oligomerów (możliwa autokataliza). Następnie ma miejsce dyfuzja niskocząsteczkowej frakcji produktów degradacji z matrycy do otoczenia oraz wnikanie wody w puste przestrzenie, co skutkuje obniżeniem oporów dyfuzyjnych a także erozją materiału. Ostatecznie, na skutek rozpuszczenia frakcji oligomerów powstają pory, które w zależności od grubości systemu uwalniania w różny sposób wpływają na kinetykę procesu [201, 202].

Degradacja hydrolityczna wpływa zasadniczo na zmianę właściwości polimeru. Spadek średniej masy molowej rzutuje na pogorszenie właściwości mechanicznych elementu [203, 204]. Powstanie oligomerów skutkuje zwiększeniem stężenia kwaśnych grup końcowych, co prowadzi do obniżenia pH i autokatalizy reakcji hydrolizy [205]. Frakcja o niskiej masie molowej, w zależności od struktury może ulegać krystalizacji, zwiększając opory dyfuzyjne wewnątrz materiału i utrudniać wnikanie wody lub

wręcz przeciwnie – może dać efekt plastyfikacji o odwrotnym działaniu [206, 207]. Oba te zjawiska wpływają dodatkowo na właściwości termiczne polimeru i mogą nawet spowodować przejście ze stanu szklistego do lepkosprężystego lub odwrotnie, o ile przejścia te znajdują się blisko temperatury użytkowania.

5.2. Zjawisko erozji podczas degradacji hydrolitycznej poliestrów biodegradowalnych

Chemicznemu rozkładowi wiązań towarzyszy erozja fizyczna. Pojęcie to obejmuje straty materiału na skutek dyfuzji oligomerów z degradującej masy polimeru. Jest to złożone zjawisko, którego szybkość oraz mechanizm zależą od kinetyki hydrolizy, szybkości absorbowania wody, rozpuszczania i dyfuzji oligomerów, zmian w morfologii materiału (pęknięcia, pory) a także jego wymiarów zewnętrznych i kształtu.

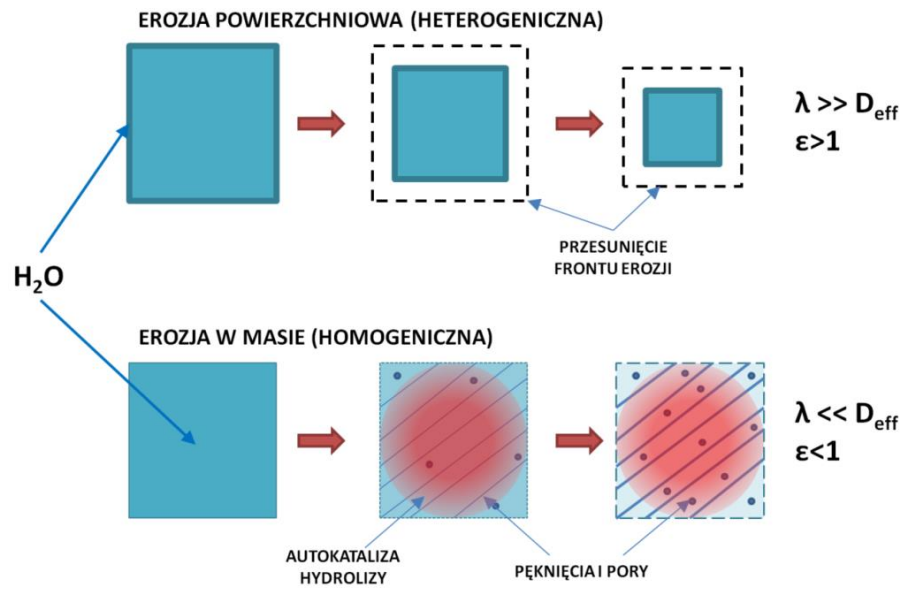
Można rozróżnić dwa główne typy erozji:

- heterogeniczna (powierzchniowa) – przebiega od powierzchni zewnętrznej, zwanej frontem erozji, do środka materiału. W idealnym przypadku jej szybkość jest proporcjonalna do zewnętrznego pola powierzchni i nie ulega gwałtownym zmianom. Ten typ erozji sprzyja bardziej równomiernemu uwalnianiu leków oraz zachowaniu lepszych właściwości mechanicznych materiału w czasie.
- homogeniczna (w masie) – przebiega w całej objętości materiału i nie powoduje dużej zmiany w jego wymiarach zewnętrznych. Często towarzyszy jej zjawisko autokatalizy reakcji hydrolizy ze względu na długą drogę dyfuzji kwaśnych produktów degradacji ze środka materiału do otoczenia. Sprzyja również tworzeniu się porów i pęknięć. Z tego względu erozja w masie nie zachodzi ze stałą szybkością i jest procesem bardziej skomplikowanym niż wariant powierzchniowy. Często występuje w przypadku biodegradowalnych poliestrów alifatycznych takich jak PLA, PGA i ich kopolimery [208,209].

Mechanizm erozji wynika z wzajemnego stosunku prędkości, z jaką zachodzi reakcja chemicznego rozerwania łańcuchów oraz szybkości dyfuzji wody w głąb polimeru. Jeżeli przeważa pierwszy proces – zachodzi erozja heterogeniczna, w przeciwnym przypadku erozja jest homogeniczna (Rys. 10). Wypadkową powyższych zjawisk jest tzw. liczba erozji ε , którą można obliczyć wykorzystując Równanie 28. Jeżeli $\varepsilon > 1$ to erozja zachodzi na powierzchni materiału, jeżeli zaś $\varepsilon < 1$ to przebiega w masie [210].

$$\varepsilon = \frac{\langle L \rangle^2 \lambda \pi}{4D_{eff}(\ln[\langle L \rangle] - \ln \left[\frac{\sqrt[3]{\overline{Mn}}}{N_A(N-1)\rho} \right])} \quad (28)$$

gdzie: $\langle L \rangle$ - połówkowa grubość materiału; λ - stała szybkości hydrolizy związana z okresem półtrwania wiązania; D_{eff} - efektywny współczynnik dyfuzji; \overline{Mn} - liczbowo średnia masa molowa; N_A - liczba Avogadro; N - stopień polimeryzacji; ρ - gęstość polimeru;



Rys. 10. Schemat mechanizmu erozji powierzchniowej (heterogenicznej) i w masie (homogenicznej)

6. Charakterystyka procesu elektroprzędzenia

Na przestrzeni lat, opracowano wiele różnych sposobów inkorporacji substancji o działaniu terapeutycznym do matrycy, z której następnie mogą zostać uwolnione. Jednym z nich, pozwalającym na otrzymanie systemów kontrolowanego uwalniania leku w formie nanomateriału o strukturze włókniny jest elektroprzędzenie. Polega ono na wyciąganiu nano- lub mikrowłókien z roztworów lub stopów polimerowych, przy użyciu sił pola elektrycznego.

Historia badań nad zjawiskami, leżącymi u podstaw procesu elektroprzędzenia sięga XIX wieku. Już w 1882 roku Rayleigh opisał zachowanie się naładowanej elektrycznie kropli wody oraz obliczył teoretyczną wartość przyłożonego potencjału elektrycznego, potrzebnego do jej rozerwania [211]. Rozwinięciem tego zagadnienia zajmował się m.in. Zeleny, który w 1914 roku opisał niestabilność powierzchni naładowanej elektrostatycznie cieczy, znajdującej się na końcu metalowej kapilary [212]. Jego prace zapoczątkowały próby matematycznego modelowania zachowania się strumienia cieczy, będącego pod wpływem działania sił elektrostatycznych [213]. Pod koniec lat 20-tych XX wieku zaczęto dostrzegać potencjał produkcyjny, kryjący się w metodzie pozyskiwania włókien z wykorzystaniem sił pola elektrycznego. Formhals pracował nad rozwinięciem koncepcji zapoczątkowanych przez wcześniejszych badaczy oraz usprawnił działanie aparatury. Konsekwencją było ukazanie się w latach 1934-1944 kilkunastu patentów jego autorstwa, dotyczących m.in. konstrukcji urządzeń do pozyskiwania „elektrycznie przędzonych sztucznych włókien” z materiałów takich jak octan celulozy [214]. Jednocześnie Rosenblum i Petryankov-Sokolov w 1938 r. opracowali elektroprzędzony materiał filtracyjny, który został wykorzystany w produkcji masek przeciwgazowych [215]. W modelowaniu matematycznym procesu elektroprzędzenia, kluczową rolę odegrały badania prowadzone przez Taylora, który w latach 1964-1969 pracował nad opisem zmiany kształtu naładowanej kropli cieczy z kulistego, utrzymywanego jedynie siłami kohezji i napięcia powierzchniowego, na stożkowy, wymuszony poprzez działanie sił wytworzonego pola elektrycznego [216]. Kształt formujący się na skutek oddziaływania ładunków zgromadzonych na powierzchni cieczy z polem elektrycznym nazwano „stożkiem Taylora”. W następnych latach osiągnano kolejne kamienie milowe w rozwoju elektroprzędzenia. Badano wpływ poszczególnych parametrów na przebieg procesu oraz postać otrzymanych włókien. W 1981r. skonstruowano aparaturę do prowadzenia elektroprzędzenia ze stopu [217]. Udowodniono również, że istnieje wiele substancji wielkocząsteczkowych, które można przetwarzać tym sposobem oraz znaczna liczba możliwych do otrzymania struktur, zarówno w skali pojedynczych włókien (np. porowate, puste w środku, typu rdzeń-powłoka) jak i całej włókniny (warstwowe, gradientowe). Zaproponowano też wiele metod uzyskiwania orientacji włókien względem wybranego kierunku, poprzez zastosowanie różnego rodzaju odbieralników tj. obrotowe, krawędziowe czy też wykorzystujące szczelinę powietrzną. W celu podniesienia wydajności produkcyjnej dokonano wielu modyfikacji i usprawnień aparatury, m.in. zwiększając ilość kapilar a także projektując systemy „bezkapilarowe” (tj. „nanospider”) [218]. Przeprowadzono również elektroprzędzenie układów wielofazowych takich jak emulsje i zawiesiny, otrzymując odpowiednio heterogeniczne lub kompozytowe włókna. Podjęto także zakończone sukcesem próby połączenia procesu elektroprzędzenia z drukiem 3D. Duża liczba wariantów

przewodzenia tego procesu w połączeniu z szeroką gamą materiałów, które można za jego pomocą przetwarzać, a także stosunkowo niskimi kosztami aparatury i jej prostotą, spowodowały znaczny wzrost zainteresowania badaczy elektroprzędzeniem, który nabrał rozpędu w latach 90-tych XX wieku. Poskutkowało to rozszerzeniem aplikacyjności nanowłókien. Oprócz zastosowań w filtracji gazów i cieczy, włókniny otrzymane tą metodą badane są obecnie pod kątem wykorzystania w bateriach, ogniwach fotowoltaicznych, kondensatorach, ogniwach paliwowych, diodach LED, tranzystorach FET i czujnikach, a także jako nośniki katalizatorów, elementy odzieży ochronnej, adsorbenty czy napełniacze kompozytów. Wraz z rozwojem biomateriałów, pojawiła się możliwość aplikacji elektroprzędzonych nanowłókien w medycynie i farmacji. Oprócz wspomnianych systemów kontrolowanego uwalniania leków, opracowywane są materiały opatrunkowe, implanty czy też rusztowania komórkowe wspomagające regenerację różnego rodzaju tkanek. Obecnie elektroprzędzenie jest coraz częściej wykorzystywane w wielu badaniach z różnych dziedzin nauki ze względu na rosnące zainteresowanie nanostrukturami oraz nanotechnologią [219, 220].

Jak wcześniej wspomniano, proces elektroprzędzenia polega na wytwarzaniu polimerowych mikrowłókien lub nanowłókien z roztworu lub stopu za pośrednictwem działania sił pola elektrycznego. Są one generowane na skutek przyłożenia napięcia prądu elektrycznego o różnej polaryzacji, pomiędzy przędzoną cieczą a odbieralnikiem włókien. Na kroplę cieczy znajdującą się na końcu kapilary przędzalniczej, działają siły kohezji oraz napięcia powierzchniowego, starające się utrzymać jej kulisty kształt w polu grawitacyjnym. Po przyłożeniu napięcia prądu elektrycznego, jej powierzchnia ulega polaryzacji. Zwiększenie wartości potencjału powoduje wzrost gęstości ładunków nagromadzonych w kropli, co skutkuje zmianą jej kształtu na stożkowy. Zaobserwowano, że gdy kąt pomiędzy powierzchnią boczną powstałego stożka a jego podstawą jest równy $49,3^\circ$ ustala się stan równowagi pomiędzy siłami działającymi na kroplę. W takich warunkach tworzy się wspomniany wcześniej „stożek Taylora”, z wierzchołka którego po przekroczeniu pewnej krytycznej wartości potencjału zostaje zainicjowany wyrzut naładowanego strumienia cieczy, który przemieszcza się w kierunku odbieralnika. Pokrewne zjawisko, będące niejako protoplastą elektroprzędzenia - tzw. elektrorozpylenie, prowadzi do wytworzenia strumienia kropeł. Podstawy fizyczne obu procesów są zbliżone, jednak w przypadku elektrorozpylenia zazwyczaj wykorzystywane są roztwory o małej lepkości, bądź zawierające rozpuszczone substancje małowcząsteczkowe [221].

Chociaż istnieją zaawansowane urządzenia pozwalające na wykonywanie elektroprzędzenia na skalę większą niż laboratoryjna, to zestaw podstawowy do przeprowadzenia procesu jest bardzo prosty i składa się jedynie z 4 głównych elementów. Są nimi: źródło wysokiego napięcia, przewodząca dysza przędzalnicza w formie kapilary (np. stalowa igła), zasobnik, w którym znajduje się roztwór polimeru bądź jego stop, system dozowania, najczęściej pompa infuzyjna, oraz odbieralnik (kolektor) włókien, usytuowany w pewnej odległości od dyszy. Całość najczęściej zamknięta jest w komorze, która w nieco bardziej zaawansowanych wersjach aparatury, pozwala na kontrolowanie temperatury oraz wilgotności względnej powietrza w czasie prowadzenia procesu. Sama metoda nie należy do skomplikowanych i polega na dozowaniu roztworu lub stopu polimerowego z zasobnika do dyszy, podłączonej za pomocą elektrody do zasilacza wysokiego napięcia. W celu skupienia włókien na kolektorze, do odbieralnika bardzo często przykłada się elektrodę o przeciwnym znaku polaryzacji.

W wytworzonym polu elektrycznym następuje wyrzut naładowanego strumienia roztworu z wierzchołka kropli znajdującej się na końcu dyszy przędzalniczej. W trakcie jego przemieszczania się następuje rozciągnięcie oraz zestalenie w postaci włókna, poprzez odparowanie rozpuszczalnika z roztworu lub wychłodzenie stopu [222].

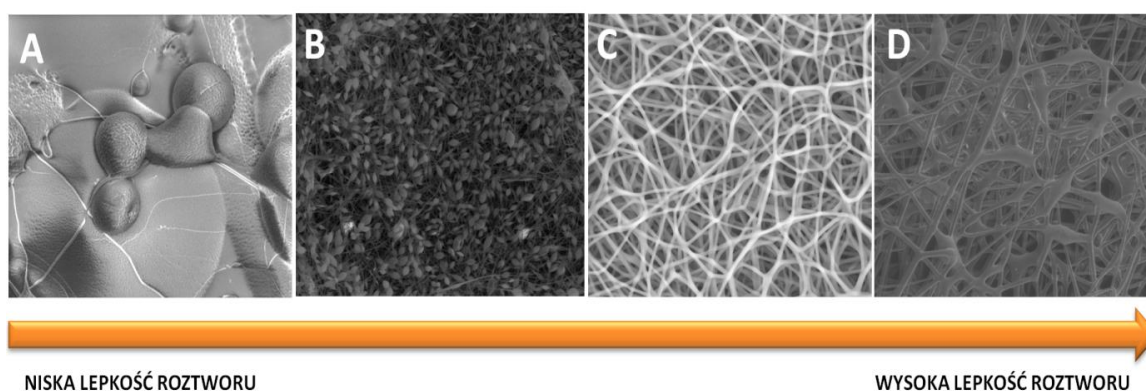
Pomimo prostoty elektroprzędzenia, podstawy fizyczne tego procesu są dużo bardziej skomplikowane. Nakładają się tu efekty wielu różnych zjawisk fizycznych. Wpływ na przebieg procesu ma zarówno natężenie oraz geometria pola elektrycznego, właściwości roztworu lub stopu polimerowego, warunki otoczenia, a także parametry przepływu cieczy przez dyszę. Czynniki umożliwiające sterowanie elektroprzędzeniem można sklasyfikować w trzech głównych kategoriach. Są to parametry wykorzystywanego roztworu lub stopu polimerowego, parametry procesowe wynikające ze specyfikacji aparatury oraz parametry otoczenia panujące w komorze. Zazwyczaj ich wzajemna relacja decyduje o przydatności włókniny pod względem konkretnego zastosowania, zatem, uzyskanie odpowiedniej struktury wymaga odpowiedniej optymalizacji. Należy przy tym pamiętać, że manipulując jednym z parametrów, niejednokrotnie wpływa się na zmianę kolejnego [222]. Klasyfikację czynników, na których opiera się proces elektroprzędzenia przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Podział parametrów wpływających na morfologię nanowłókien

Parametry roztworu/stopu polimerowego		Parametry procesowe (aparaturowe)		Parametry otoczenia
Główne:	Zależne od:	Główne:	Zależne od:	Główne:
-Lepkość	- stężenia polimeru w roztworze; - średniej masy molowej polimeru; - struktury łańcucha polimerowego (np. rozgałęzień); - lepkości rozpuszczalnika; - oddziaływań międzycząsteczkowych;	-Natężenie pola elektrycznego	- wartości różnicy potencjałów pomiędzy cieczą a kolektorem; - odległości pomiędzy dyszą a kolektorem;	- Temperatura powietrza - Wilgotność względna powietrza
-Napięcie powierzchniowe	- sił kohezji; - lepkości roztworu/stopu; - rodzaju rozpuszczalnika;	-Typ kolektora włókien	- pola powierzchni; - obecności krawędzi; - kształtu; - szybkości obrotowej;	
-Przewodnictwo elektryczne	- przewodnictwa rozpuszczalnika; - przewodnictwa polimeru; - dodatków (np. substancji o budowie jonowej);	- Typ dyszy	- średnicy kapilary; - liczby kapilar lub ich braku;	
-Lotność rozpuszczalnika		- Szybkość dozowania roztworu/stopu		

Jednym z kluczowych paramentów wpływających na proces elektroprzędzenia jest lepkość roztworu. Warunkuje ona powstawanie różnego rodzaju struktur, które można otrzymać tą metodą. Jej zbyt niska wartość uniemożliwia wytworzenie gładkich, ciągłych włókien gdyż zachodzi konkurencyjne elektrorozpylenie. Stopniowo zwiększając lepkość danego roztworu w pierwszej kolejności

uzyskiwane są tzw. „koraliki” (*ang. beads*), będące formą przejściową pomiędzy cząstkami polimerowymi w kształcie kuli, otrzymywanymi na drodze elektrorozpylenia a elektroprzędzonymi włóknami. Generalnie istnieje pewien zakres lepkości roztworu, dla którego możliwe jest uzyskanie gładkich włókien o przekroju kołowym. Wraz ze wzrostem lepkości następuje zwiększenie wartości średnic włókien, a jej zbyt wysoka wartość poważnie utrudnia wyrzut strumienia z wierzchołka *stożka Taylora*, co wymusza stosowania silniejszego pola elektrostatycznego. Otrzymane w ten sposób włókna bardzo często są spłaszczone lub zdeformowane, ponieważ w takich warunkach odparowanie rozpuszczalnika z roztworu jest utrudnione. W rezultacie powstają mikro-wstążki polimerowe [223]. Przykłady możliwych do otrzymania struktur przedstawiono na Rys. 11.



Rys. 11. Przykłady otrzymywanych struktur w zależności od lepkości roztworu polimerowego podczas elektroprzędzenia: folia otrzymana poprzez połączenie się ze sobą cząstek elektrospreju (A), tzw. „koraliki” (B), nanowłókna (C) oraz mikrowstążki (D)

Od masy cząsteczkowej oraz struktury polimeru (liniowej lub rozgałęzionej) zależy splątanie łańcuchów. Czynniki te wpływają na opór wewnętrzny przeciwdziałający płynięciu roztworu, który rośnie wraz ze wzrostem stężenia polimeru. Fizyczne splątanie łańcuchów oraz oddziaływania międzycząsteczkowe pomiędzy grupami funkcyjnymi w polimerze i rozpuszczalniku wpływają na postać produkowanych włókien, ponieważ są powiązane z lepkością roztworu i napięciem powierzchniowym. Wysokie napięcie powierzchniowe utrudnia przeprowadzenie procesu elektroprzędzenia, jednak możliwe jest jego obniżenie poprzez dodatek surfaktantu lub rozpuszczalnika o jego mniejszej wartości [224]. Dzięki temu, możliwe jest otrzymanie nanowłókien przy użyciu słabszego pola elektrycznego. Ważnym parametrem, wpływającym na stabilność naładowanego strumienia wyrzucanego z wierzchołka stożka Taylora jest przewodnictwo elektryczne. Jego wzrost generalnie sprzyja powstawaniu cieńszych włókien. Dzieje się to jednak kosztem poszerzenia zakresu wartości średnic otrzymanych, szczególnie, jeśli proces prowadzono przy dużej wartości pola elektrostatycznego [225]. W niektórych układach, zbyt wysokie przewodnictwo roztworu uniemożliwia wyciąganie włókien, ze względu na powstawanie łuków elektrycznych, co skutkuje utratą polaryzacji powierzchni cieczy. Ważną rolę w procesie elektroprzędzenia, odgrywa też lotność rozpuszczalnika, ponieważ wpływa na szybkość formowania i zestalania się włókien, co rzutuje na ich rozmiary oraz determinuje porowatość powierzchni. Stosując rozpuszczalniki o małej lotności otrzymuje się spłaszczone włókna, zaś zbyt łatwe odparowywanie rozpuszczalnika powoduje jego

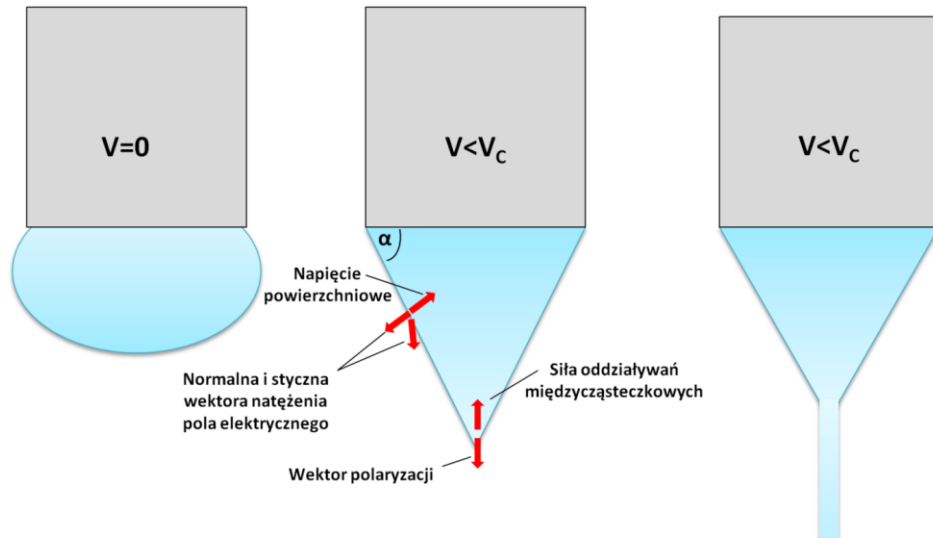
przedwczesne zestalenie się, co uniemożliwia dalsze rozciąganie przez siły pola elektrycznego [224]. W praktyce często wykorzystywane są mieszaniny rozpuszczalników różniące się lotnością. Ustalając odpowiedni stosunek objętościowy składników, uzyskuje się pożądaną wartość tego parametru pod kątem otrzymania danej struktury [226].

Zgodnie z prawem Coulomba, dwa punktowe ładunki elektryczne oddziałują wzajemnie na siebie z pewną siłą, proporcjonalną do iloczynu tych ładunków oraz odwrotnie proporcjonalną do kwadratu odległości między nimi. Przyłożenie elektrod zasilaczy wysokiego napięcia do dyszy przędzalniczej oraz odbieralnika włókien skutkuje powstaniem pola elektrostatycznego, którego siły oddziałują na naładowaną kroplę roztworu polimeru. Wartość przyłożonego potencjału jest kluczowa i stanowi podstawę procesu elektroprzędzenia. Jednak jego wpływ na postać i średnice otrzymywanych włókien stanowi sporną kwestię, ponieważ w wielu badaniach uzyskano niejednokrotnie sprzeczne ze sobą wyniki. Przyczyną jest silny związek siły pola elektrycznego z przewodnictwem przędzonej cieczy, geometrią odbieralnika oraz dyszy, a także odległością pomiędzy tymi elementami, która warunkuje czas przędzenia, a co za tym idzie wpływa na rozmiary włókien. Zbyt krótka droga, którą pokonuje przędzony strumień roztworu polimeru powoduje, że włókna nie mają wystarczająco dużo czasu, aby ulec zestaleniu zanim dotrą do kolektora. Odbierane są w postaci spłaszczonej jak w przypadku roztworów od dużej lepkości. Zwiększając drogę przędzenia uzyskuje się cieńsze włókna. Wzrost szybkości dozowania roztworu, pozwala na szybsze prowadzenie procesu. Jednak, jeżeli odbywa się on zbyt szybko, pojawia się tendencja do powstawania grubszych włókien lub ich zlewania się na powierzchni odbieralnika w jednolitą warstwę. Wynika to z przędzenia większej masy roztworu polimeru w jednostce czasu i niedostatecznemu wysychaniu włókien. Dlatego, optymalizując szybkość dozowania należy skontrolować, czy otrzymywane włókna mają wystarczająco dużo czasu na zestalenie się [223].

Ważną rolę podczas elektroprzędzenia odgrywają warunki panujące wewnątrz urządzenia. Temperatura wpływa głównie na lepkość roztworu oraz szybkość odparowywania rozpuszczalnika. Wraz z jej wzrostem, pomimo spadku lepkości rozpuszczalnik odparowuje szybciej, co powoduje wzrost wartości średnic włókien. Przy niższych temperaturach, otrzymywane są zatem cieńsze włókna. Wilgotność powietrza wpływa głównie na prężność par rozpuszczalnika. Przy jej małej wartości odparowuje on szybko, co skutkuje wzrostem średnic. Otrzymywaniu cienkich włókien sprzyja zaś wyższa wilgotność powietrza, jednak w przypadku, gdy jest zbyt wysoka może również dojść do częściowej neutralizacji ładunków elektrycznych na powierzchni naładowanego strumienia roztworu, co powoduje osłabienie działających na niego sił i w rezultacie uzyskania większych rozmiarów włókien [225].

Jak wcześniej wspomniano, przyłożenie wysokiego napięcia do kropli roztworu lub stopu polimeru powoduje zmianę jej kształtu. Dzieje się tak, ponieważ jednoimiennie ładunki elektrostatyczne zgromadzone na powierzchni cieczy generują powstanie sił wzajemnego odpychania elektrostatycznego. Dodatkowo, zewnętrzne pole elektryczne wytworzone pomiędzy różnoimiennie naładowanymi elementami aparatury: dyszą przędzalniczą i kolektorem włókien powoduje, że na kroplę działa dodatkowo siła Coulomba. Czynniki te wymuszają zmianę kulistego kształtu o niższej energii, który jest utrzymywany poprzez siły napięcia powierzchniowego oraz kohezji do kształtu

stożkowego. Gęstość ładunku elektrycznego na powierzchni cieczy zwiększa się w kierunku jego wierzchołka. Po osiągnięciu pewnej krytycznej wartości zastosowanego potencjału prądu V_C (Równanie 29) zostaje zainicjowany wyrzut naładowanego strumienia cieczy, który przemieszcza się w polu elektrycznym w celu utraty zgromadzonego ładunku [227]. Styczna pola elektrycznego przyspiesza nośniki ładunków w cieczy, co skutkuje ruchem całego rozpatrywanego odcinka strugi w kierunku przeciwelektrody w celu zamknięcia obwodu elektrycznego. Zmiany kształtu kropli roztworu lub stopu polimeru pod wpływem wartości przyłożonego potencjału prądu, a także siły działające na stożek Taylora obrazuje Rys. 12 [228].



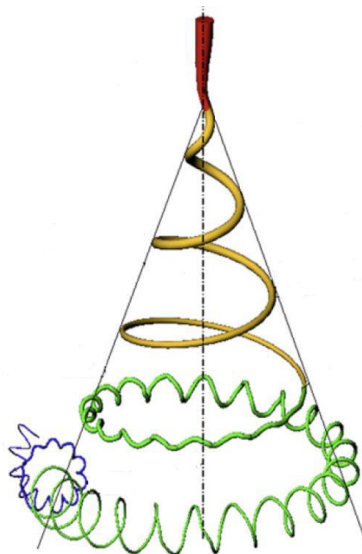
Rys. 12. Zmiany kształtu kropli cieczy znajdującej się na końcu kapilary pod wpływem wartości zastosowanego potencjału prądu elektrycznego, oraz siły działające na stożek Taylora

$$V_C = \sqrt{4 \left[\frac{H^2}{L^2} \right] \cdot \left[\ln \frac{2L}{R} - 1,5 \right] \cdot [0,117\pi R\gamma]} \quad (29)$$

gdzie: H - odległość od kapilary do kolektora; L - długość kapilary; R - promień kapilary; γ - napięcie powierzchniowe;

Podczas elektroprzędzenia, naładowany strumień cieczy początkowo porusza się stabilnie i prostoliniowo, zgodnie z liniami pola elektrycznego. W tym czasie następuje jego wydłużenie, czego konsekwencją jest zmniejszenie średnicy. Ilość nośników ładunku jest stała, jednak powierzchnia, na której są one zgromadzone ulega redukcji, co skutkuje wzrostem sił odpychania. Prowadzi to do powstania punktu niestabilności, w którym struga zaczyna poruszać się w sposób niekontrolowany, po czym przechodzi w całkowicie chaotyczny. Zatem, w strumieniu roztworu lub stopu polimeru formującemu się w trakcie elektroprzędzenia można wydzielić dwie główne strefy znacznie różniące się trajektorią. W pewnej odległości od końca stożka Taylora ruch liniowy zostaje zaburzony i przyjmuje postać niestabilną, przechodzącą wraz ze wzrostem odległości od dyszy przędzalniczej w całkowicie chaotyczną (Rys. 13). Położenie punktu niestabilności oraz zachowanie się naelektryzowanego strumienia zależą od właściwości roztworu/stopu jak i samych parametrów procesu. Zaobserwowano, że większe przewodnictwo cieczy oraz wygenerowanie dużej ilości

jednoimiennych ładunków powierzchniowych sprzyja łatwemu powstawaniu niestabilności. Z drugiej strony, długi odcinek prostoliniowy ruchu elektroprzódzonego strumienia jest charakterystyczny przy wysokiej lepkości i dużym napięciu powierzchniowym roztworu polimerowego [229].



Rys. 13. Schemat przedstawiający rozwój niestabilności strugi elektroprzódzonego roztworu [229]

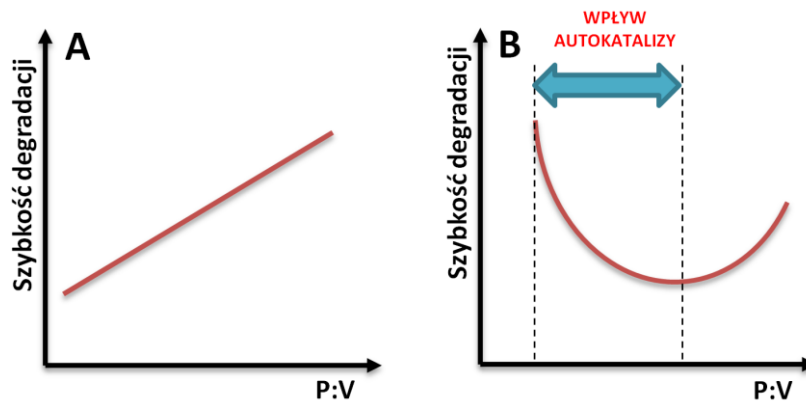
6.1. Degradacja hydrolytyczna nanowłóknin otrzymanych metodą elektroprzędzenia

Biodegradowalne włókniny otrzymane metodą elektroprzędzenia są zaliczane do nanomateriałów. Ulegają one degradacji hydrolytycznej zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* według tych samych zasad, co obiekty o strukturze w skali „makro”, jednak proces ten ma nieco inny przebieg. Nanowłókniny zalicza się do struktur porowatych, o wysokim stosunku powierzchni do objętości (P:V), co w zasadniczy sposób zmienia sposób ich interakcji z medium degradacyjnym. Przede wszystkim rozwinięciu ulega powierzchnia międzyfazowa, zaś mała objętość nanowłóknin powoduje, że droga dyfuzji wody w głąb materiału jest krótka. Zwiększa to prawdopodobieństwo zajścia hydrolyzy. Zatem, wydawałoby się, że degradacja hydrolytyczna będzie przebiegać szybciej w tego typu materiałach. Sytuacja jednak jest znacznie bardziej skomplikowana, gdyż na wypadkową szybkości degradacji składa się o wiele więcej czynników, w tym rodzaj polimeru (jego hydrofilowość, krystaliczność oraz temperatura zeszklenia (T_g)). Rozwinięcie powierzchni kontaktu z medium nie jest bowiem jedynym skutkiem procesu elektroprzędzenia. Cui *et al.* w swojej pracy zaobserwował, że wraz ze zwiększeniem powierzchni właściwej próbki, w znaczny sposób rośnie jej hydrofobowość. Dla folii z PLLA kąt zwilżania wyniósł $69,58 \pm 6,6^\circ$, zaś po elektroprzędzeniu jego wartość wzrosła dwukrotnie, do $140,1 \pm 7,8^\circ$ [230]. Efekt ten jest charakterystyczny dla struktur o rozwiniętej powierzchni [231]. Nanowłókniny często różnią się zawartością fazy krystalicznej, w porównaniu do struktur otrzymanych z tych samych polimerów semikrystalicznych, wytworzonych innymi metodami, co na przykładzie PCL w swojej pracy opisał Lee *et al.* W tym przypadku nanowłóknina wykazywała mniejszy stopień krystaliczności (X_c 51%), niż folia otrzymana ze stopu (X_c 67%). Miało to związek z orientacją łańcuchów polimerowych wzdłuż osi włókna, co spowodowało opóźnienie krystalizacji.

Ważną rolę odegrał tu dobrany układ rozpuszczalników w procesie elektroprzędzenia, a także szybkość chłodzenia stopu podczas wylewania folii [232].

Aby przewidzieć szybkość degradacji hydrolitycznej włókien otrzymanych metodą elektroprzędzenia, należy wziąć pod uwagę wiele zjawisk. Proces ten, jest jednak dynamiczny i często ulega zmianom w czasie, które mogą wynikać z ewolucji morfologii powierzchni włókien, oraz charakterystycznego dla poliestrów biodegradowalnych efektu autokatalizy. Jeżeli chodzi o pierwszy z wymienionych czynników, to zaobserwowano dwa główne warianty. W przypadku polimerów amorficznych lub/i o niskiej temperaturze zeszklenia zachodzi „zlewianie” się włókien. Wynika ono z inkubacji materiału w czasie degradacji hydrolitycznej w temperaturze zbliżonej do T_g , lub obniżeniem wartości tego parametru na skutek powstawania oligomerów o plastyfikującym działaniu. Przyczyną „zlewania się” nanowłókien jest zatem pewna mobilność łańcuchów w temperaturze inkubacji. W niektórych przypadkach dochodzi również do skurczu włókniny, gdyż następuje indukowana termicznie relaksacja naprężeń powstałych w fazie amorficznej podczas elektroprzędzenia [233]. Wszystkie wymienione zjawiska prowadzą do zmniejszenia objętości przestrzeni pomiędzy włóknami, a także często powodują wzrost średnic nanowłókien, co może spowalniać proces degradacji. W przypadku polimerów o strukturze krystalicznej lub/i wysokiej temperaturze zeszklenia, obserwowane jest zaś pękanie włókien. Wynika ono z pewnej sztywności i kruchości fazy uporządkowanej, która często wzrasta na skutek erozji, ponieważ powstają defekty powierzchni działające jak tzw. karby. Pękanie włókien samo w sobie ma niewielki wpływ na szybkość degradacji, jednak powoduje pewne rozwinięcie powierzchni właściwej i wpływa na właściwości mechaniczne [234].

Wspomniany wcześniej efekt autokatalizy reakcji hydrolizy wiązań estrowych jest zasadniczo powiązany z mechanizmem degradacji polimeru. Jak opisano w Rozdziale 5.2, wyróżnia się erozję powierzchniową (heterogeniczną) oraz erozję w masie (homogeniczną). Dla materiałów o strukturze makroskopowej, w przypadku procesu powierzchniowego autokataliza odgrywa pomijalną rolę, zaś w drugim ma kluczowe znaczenie. Ogólnie przyjmuje się, że erozja heterogeniczna jest najczęstszym mechanizmem degradacji polimerów krystalicznych i hydrofobowych, które charakteryzują się dużymi oporami dyfuzyjnymi dla wnikania wody. W przypadku nanowłókien, ze względu na duży stosunek P:V zachodzi ona znacznie szybciej niż dla innego rodzaju struktur, o mniejszym rozwinięciu powierzchni. Ze względu na niewielkie rozmiary nanowłókien, erozja w masie ma w tym przypadku nieco mniejsze znaczenie niż dla obiektów litych, o dużej grubości, gdzie wyraźnie zaznacza się wpływ autokatalizy, prowadzący czasami do uzyskania pustych w środku struktur. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stosunku P:V szybkość degradacji zachodzącej zgodnie z procesem erozji w masie maleje. Dzieje się tak, ponieważ ze względu na skrócenie drogi dyfuzji, odprowadzanie małowcząsteczkowych produktów degradacji do medium jest coraz łatwiejsze. Powoduje to ograniczenie ich wpływu na zakwaszenie środowiska degradacji. Jednak, w przypadku nanowłókien o bardzo dużej powierzchni kontaktu szybkość degradacji ponownie zaczyna wzrastać. Tak więc istnieje pewna wartość stosunku P:V, przy której degradacja polimerów charakteryzujących się erozją homogeniczną jest najwolniejsza (Rys. 14) [235].



Rys. 14. Zależność szybkości degradacji hydrolytycznej od stosunku powierzchni do objętości (P:V) materiału polimerowego, zachodzącej według mechanizmu erozji powierzchniowej (z lewej) i erozji w masie (z prawej) [235]

Odnosząc powyższe rozważania do konkretnych badań przeprowadzonych na poliestrach biodegradowalnych, będących również w formie włókien zaobserwowano, że zmniejszając rozmiary obiektów ze skali „makro” (w mm) do „mikro” a później do skali „nano”, degradacja przebiega w zdecydowanie różny sposób. Polimery takie jak PLLA i PCL ze względu na strukturę utrudniającą wnikanie wody wykazują przewagę procesów erozji heterogenicznej, zaś szybkość ich degradacji rośnie wraz ze wzrostem stosunku P:V [236]. W przypadku PDLA przy przejściu ze skali „makro” do „mikro” degradacja zwalnia, gdyż ograniczony zostaje wpływ efektu autokatalizy, jednak zmniejszając rozmiary obiektu do skali „nano” obserwuje się przyspieszenie szybkości degradacji ze względu na rozwinięcie powierzchni [237, 238]. Hydrofilowy i semikrystaliczny PGA degraduje szybciej ze wzrostem stosunku P:V, zaś amorficzny kopolimer PDLGA wykazuje odwrotną tendencję [235].

Nanowłókna otrzymane metodą elektroprzędzenia są dużo bardziej podatne na działanie enzymów niż materiały lite i o mniejszej porowatości, ponieważ ze względu na duże rozmiary cząsteczek słabo penetrują one polimer. Degradacja enzymatyczna zachodzi głównie powierzchniowo, co przy dużym stosunku P:V nanowłókien powoduje bardzo szybki rozkład materiału [239, 240].

6.2. Uwalnianie leków z nanowłókien otrzymanych metodą elektroprzędzenia

Jak wcześniej wspomniano, elektroprzędzenie umożliwia otrzymanie materiałów o wysokim stosunku powierzchni do objętości (P:V). W połączeniu z właściwościami chemicznymi i fizycznymi danego polimeru, odbija się to na sposobie degradacji hydrolytycznej, co rzutuje również na kinetykę uwalniania leków. Systemy kontrolowanego uwalniania w formie nanowłókien, w porównaniu do materiałów o mniejszej porowatości i większej grubości, uwalniają leki w sposób zależny przede wszystkim od metody wprowadzenia leku do nośnika, warunków elektroprzędzenia determinujących średnicę i morfologię włókien, porowatości włókieniny oraz orientacji włókien materiału względem wybranego kierunku. Preferowane jest równomierne rozmieszczenie leku w matrycy, jednak w praktyce jest to dość trudne do zrealizowania. Zaobserwowano bowiem tendencję do migracji substancji aktywnej do powierzchni w czasie elektroprzędzenia, co w połączeniu z dużą powierzchnią właściwą często powoduje silny wyrzut początkowy. Aby temu zapobiegać, stosowane są różnego

rodzaju podejścia do wprowadzania leków do matrycy (Tabela 9). Kinetyka uwalniania leków z włóknin zazwyczaj zależy od nałożenia się na siebie efektu wyrzutu początkowego oraz procesów dyfuzji i degradacji. Zaobserwowano również, że przyspiesza wraz ze zmniejszaniem się średnic włókien oraz wzrostem porowatości ich powierzchni, co daje szczególnie silny efekt [241].

Tabela 9. Sposoby wprowadzania leków do włóknin otrzymanych metodą elektroprzędzenia

Na etapie elektroprzędzenia		Po etapie elektroprzędzenia	
Sposób	Główne czynniki kontrolujące uwalnianie	Sposób	Główne czynniki kontrolujące uwalnianie
Wspólne rozpuszczanie leku z polimerem	Dyfuzja, degradacja	Osadzanie leku na powierzchni polimeru w wyniku fizycznej modyfikacji powierzchni, wykorzystując oddziaływania: elektrostatycznych, wodorowych, Van der Waalsa	Desorpcja, rozpuszczanie, temperatura
Zawiesina leku w roztworze polimeru	Rozpuszczanie, dyfuzja		
Emulsja roztworu polimeru i roztworu leku	Degradacja, dyfuzja	Kowalencyjne związanie leku z powierzchnią polimeru (może wymagać uprzedniej aktywacji powierzchni)	Rekcje chemiczne, degradacja
Elektroprzędzenie współosiowe (włókna typu rdzeń-powłoka)	Degradacja, dyfuzja		

7. Podsumowanie części literaturowej

Niniejszy przegląd literatury miał na celu przybliżenie od strony teoretycznej tematyki zawartej w części eksperymentalnej pracy. Przedstawiono w nim analizę potrzeb i problemów pojawiających się w dziedzinie implantów medycznych, jakimi są siatki chirurgiczne, co było punktem wyjścia do podjęcia badań. Zreferowano również zagadnienia dotyczące degradacji hydrolitycznej oraz kinetyki uwalniania leków z biodegradowalnych polimerowych systemów kontrolowanego uwalniania leku. Szczególną uwagę poświęcono procesowi elektroprzędzenia oraz otrzymywanych za jego pomocą nanowłóknin, stanowiących podstawę wykonanych eksperymentów badawczych.

Część Eksperymentalna

8. Hipoteza badawcza oraz cel pracy

Analizując przedstawione w części literaturowej mechanizmy rządzące działaniem biodegradowalnych systemów kontrolowanego uwalniania leków można zauważyć, że niezależnie od czynnika limitującego kinetykę uwalniania substancji terapeutycznej do otoczenia, zawsze mają miejsce procesy transportu masy. Jest to przede wszystkim dyfuzja wody do powierzchni oraz w głąb nośnika substancji aktywnej, a także cząsteczek leku i produktów degradacji matrycy do otoczenia. Biorąc pod uwagę stwierdzenie, że systemy uwalniania w formie elektroprzędzonych włókien charakteryzują się dużym stosunkiem powierzchni do objętości, można podejrzewać, że transport wody do granicy międzyfazowej włókien nośnika leku i medium będzie odgrywać w tym przypadku kluczową rolę. Zatem, kontrolując powinowactwo systemu uwalniania do otaczającego środowiska, można potencjalnie wpłynąć na zwilżalność jego powierzchni oraz szybkość wnikania wody do jego objętości i tym samym zmienić zarówno kinetykę degradacji nośnika jak i emisji leku. W świetle tych rozważań, sformułowano następującą hipotezę badawczą:

Jeżeli do systemu uwalniania leku w formie elektroprzędzonej włókniny zostanie wprowadzony modyfikator w postaci przeplotu nanowłókien o innej hydrofilowości niż materiał matrycy, to w wyniku zmiany makroskopowej hydrofilowości systemu możliwa jest kontrola szybkości degradacji nośnika oraz kinetyki procesu uwalniania substancji aktywnej.

Celem pracy było zbadanie, czy możliwa jest modyfikacja szybkości uwalniania leku z biodegradowalnej, poliestrowej matrycy w postaci włókniny, bez zmiany jej właściwości fizycznych oraz chemicznych, a także stabilizacja właściwości mechanicznych włókniny w czasie degradacji hydrolitycznej.

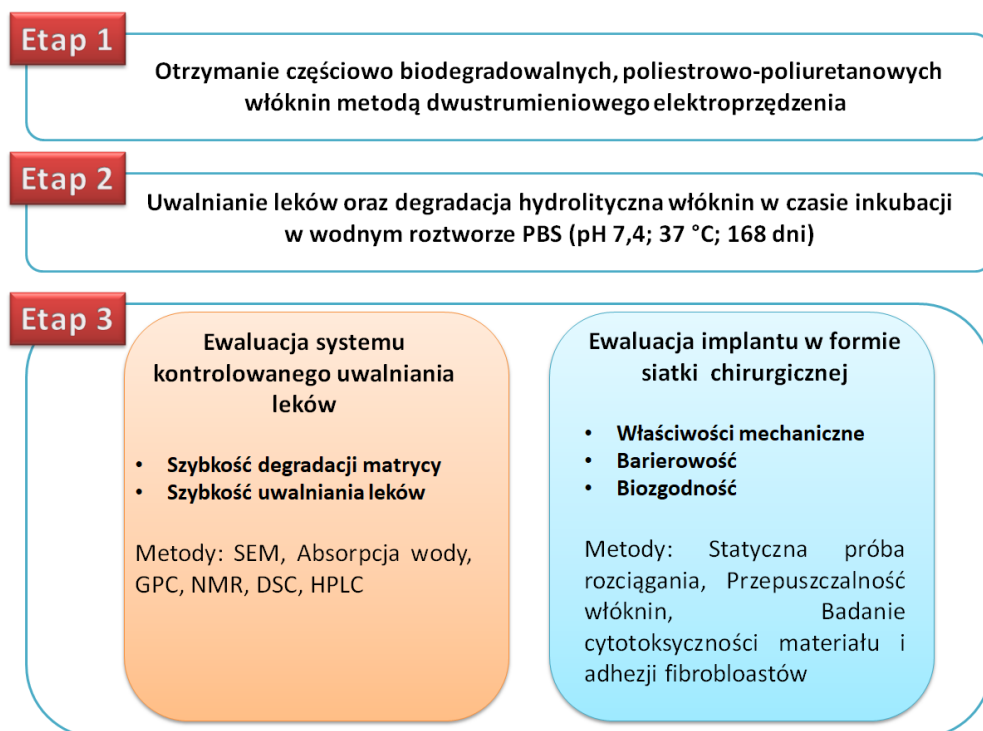
Założeniem podjętych badań było wytworzenie metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia włókniny, składającej się z przeplotu mikrowłókien biodegradowalnego, poliestrowego nośnika leku i nanowłókien nieulegającego biodegradacji, poliuretanowego modyfikatora właściwości fizycznych i mechanicznych materiału. W czasie realizacji prac podjęto próbę otrzymania takiej struktury, która pozwalałaby na połączenie funkcjonalności systemu kontrolowanego uwalniania leków i implantu medycznego formie siatki lub łąty chirurgicznej, o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu przepuklin.

9. Zakres pracy

W ramach niniejszej pracy, zbadano wpływ poliuretanowych modyfikatorów w postaci nanowłókien o różnej hydrofilowości i właściwościach mechanicznych na:

- szybkość degradacji hydrolytycznej poliestrowych mikrowłókien, stanowiących nośnik leku,
- szybkość równoczesnego uwalniania dwóch leków: trudno rozpuszczalnego w wodzie sirolimusu i łatwo rozpuszczalnej soli sodowej diklofenaku,
- zmianę właściwości mechanicznych włókien w trakcie degradacji hydrolytycznej,
- przenikanie modelowej substancji małowcząsteczkowej przez wewnętrzną strukturę włókniny,
- cytotoksyczność oraz adhezję fibroblastów na powierzchni otrzymanych materiałów.

Badania były realizowane w trzech etapach (Rys. 15). Pierwszym z nich było otrzymanie częściowo biodegradowalnych poliestrowo-poliuretanowych włókien metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia. Były one następnie inkubowane w wodnym roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanem o pH 7,4 w temperaturze 37 °C przez okres 168 dni (pół roku). Ostatnim etapem była ewaluacja badanych materiałów *in vitro* pod kątem zastosowania, zarówno, jako system kontrolowanego uwalniania leków oraz jako implant chirurgiczny.



Rys. 15. Schemat przedstawiający tok przeprowadzonych badań

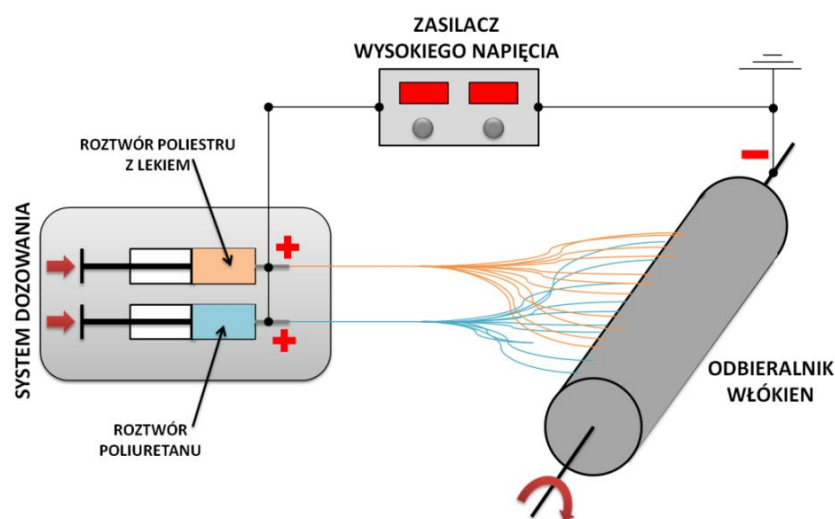
10. Materiały wykorzystane w badaniach

- Monomery wykorzystane do syntezy kopolimerów biodegradowalnych:
 - D,L-laktyd (HUIZHOU Foryou Medical Devices, Chiny),
 - glikolid (HUIZHOU Foryou Medical Devices, Chiny),
 - ε-kaprolakton (Acros Organics, Belgia),
 - węglan trimetylenu (HUIZHOU Foryou Medical Devices, Chiny).
- Inicjatory polimeryzacji:
 - acetyloacetonian cyrkonu (IV) (Zr(acac)₄) (Merck KGaA, Niemcy),
 - acetyloacetonian żelaza (III) (Merck KGaA, Niemcy).
- Polimery dostępne komercyjnie:
 - poli(ε-kaprolakton) (PCL) (Merck KGaA, Niemcy),
 - ChronoSil AL80A5% (AdvanSource Biomaterials, USA),
 - HydroThaneAR25 80A (AdvanSource Biomaterials, USA),
 - ChronoFlex AL75D (AdvanSource Biomaterials, USA).
- Leki:
 - sirolimus (rapamycyna) (LC Laboratories, USA),
 - sól sodowa diklofenaku (Merck KGaA, Niemcy).
- Rozpuszczalniki:
 - etanol (Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska),
 - chloroform (Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska),
 - chlorek metylenu (DCM) (Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska),
 - 1,1,1,3,3-hexafluoro-propan-2-ol (HFIP) (Merck KGaA, Niemcy),
 - N,N-dimetyloacetamid (DMAc) (Merck KGaA, Niemcy),
 - aceton (Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska),
 - dimetylosulfotlenek (DMSO) (Merck KGaA, Niemcy).
- Pozostałe odczynniki:
 - sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS) pH 7,4 (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Niemcy),
 - błękit bromofenolowy (BPB) (Chempur, Polska),
 - pożywka hodowlana Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Merck KGaA, Niemcy)
 - płodowa surowica bydlęca (Merck KGaA, Niemcy),
 - penicylina/streptomycyna (Merck KGaA, Niemcy),
 - test kolorymetryczny do oceny żywotności komórek Cell Counting Kit-8 (Merck KGaA, Niemcy),
 - medyczny klej silikonowy (A-100, Factor II, Inc., Lakeside, USA),
 - Invitrogen™ Viability / Cytotoxicity Kit (Thermofisher Scientific, USA).

11. Metody badawcze oraz wykorzystana aparatura

11.1. Procedura otrzymywania włókien metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia

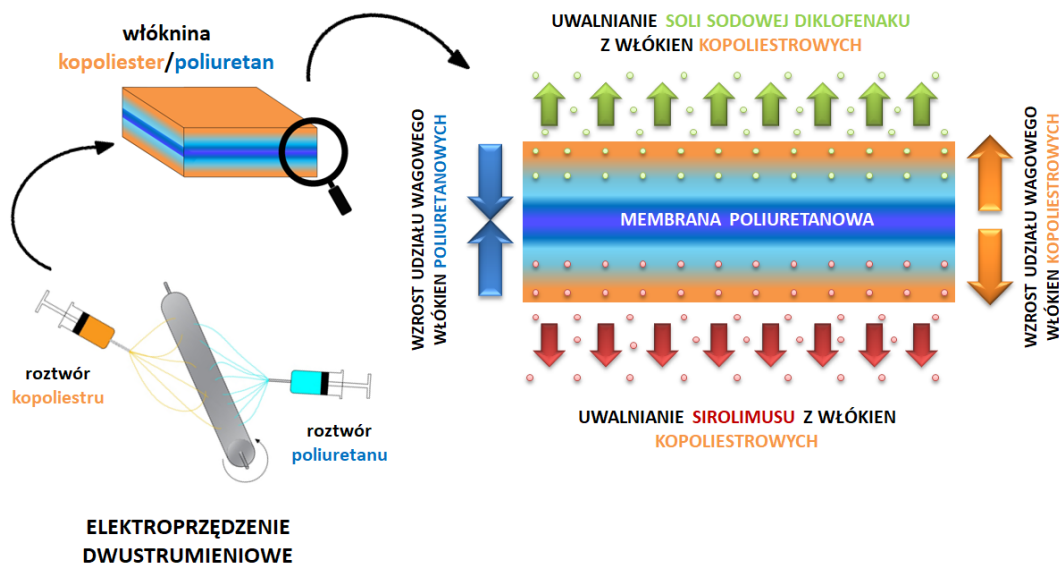
Włókniny wytworzono za pomocą aparatury do elektroprzędzenia TL-Pro-BM (Tong Li Tech, Chiny), wyposażonej w dwa zasilacze wysokiego napięcia. Elektrode pierwszego z nich, o dodatniej polaryzacji napięcia prądu elektrycznego przyłożono do dyszy przędzalniczej, natomiast elektrodę drugiego, o ujemnej polaryzacji przyłożono do odbieralnika włókien, w formie wirującego stalowego walca o średnicy 27 mm, długości 300 mm i prędkości obrotowej wynoszącej 500 obr./min. Komora środowiskowa umożliwiała prowadzenie procesu w stałej temperaturze 18 ± 1 °C przy względnej wilgotności powietrza $40\pm 5\%$. Roztwory polimerowe dozowano z określonym, zmiennym w czasie natężeniem przepływu za pomocą dwóch pomp infuzyjnych (PHD Ultra 4400, Harvard Apparatus, USA). Elektroprzędzenie dwustrumieniowe schematycznie przedstawiono na Rys. 16. Proces umożliwiał wytworzenie przeplotu dwóch frakcji włókien. Dodatkowo, stosując zmienną szybkość dozowania uzyskano strukturę gradientową, w której stosunek wagowy kopoliestru do poliuretanu zmieniał się w kierunku środka włókniny (Rys. 17).



Rys. 16. Schemat aparatury do prowadzenia procesu podwójnego elektroprzędzenia

Procedura otrzymywania dwukomponentowych materiałów była taka sama we wszystkich eksperymentach i przebiegała następująco:

- Etap I: równoczesne elektroprzędzenie roztworu kopoliestru z sirolimusem (SLM) ze zmniejszającą się w czasie szybkością dozowania oraz poliuretanu z rosnącą w czasie szybkością dozowania roztworu.
- Etap II: elektrorozpylenie roztworu poliuretanu o niskim stężeniu, ze stałą szybkością dozowania w celu wytworzenia rdzenia włókniny w postaci litej membrany, mającej stanowić strukturę ograniczającą transport leków z jednej strony materiału na drugą.
- Etap III: równoczesne elektroprzędzenie roztworu kopoliestru z solą sodową diklofenaku (DiNa), z rosnącą w czasie szybkością dozowania oraz poliuretanu z malejącą w czasie szybkością dozowania roztworu.



Rys. 17. Schematyczne przedstawienie struktury przekroju włókniny oraz koncepcji jej działania

11.2. Procedura inkubacji włókien

Przebieg każdego eksperymentu, w którym badano szybkość degradacji hydrolytycznej oraz uwalniania leków był taki sam. Włókniyny po elektroprowadzeniu najpierw wysuszone pod obniżonym ciśnieniem (20 °C, 20 mbar, 14 dni), a następnie pocięto za pomocą stalowego wykrojnika. W ten sposób otrzymano krążki o średnicy 10 mm, które zważono i umieszczono w szklanych fiolkach zawierających po 5 ml wodnego roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) o pH 7,4. Ilość próbek z danej włókniny wynosiła 4 sztuki na każdy punkt czasowy. W celu symulacji warunków panujących wewnątrz żywego organizmu, materiały inkubowano w temperaturze 37 °C. Główną część obserwacji prowadzono przez 84 dni (3 miesiące), pobierając próbki do analizy według określonego harmonogramu. Obserwacje przedłużono do 168 dnia (pół roku), aby ocenić postęp degradacji po dłuższym czasie. W tym okresie, co 7 dni wymieniano jedynie PBS, bez pobierania materiału do analizy. Po wyciągnięciu z medium degradacyjnego, włókniyny wstępnie osuszano z wilgoci zgromadzonej na powierzchni za pomocą niepalącego, chłonnego czyszcziwa. Następnie materiały ważono i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem przez 14 dni (20 °C, 20 mbar), po czym ponownie przeprowadzano ważenie. Wysuszone do stałej wagi próbki poddawano poszczególnym analizom. Zgromadzone na tym etapie dane wykorzystano do wyznaczenia ilości zaabsorbowanej przez włókniyny wody oraz do obliczenia zmiany wagi frakcji biodegradowalnej, mającej miejsce na skutek procesów degradacji i erozji (odpowiednio Równanie 30 i Równanie 31).

$$[\%] \text{Absorbacja wody} = \frac{w_m - w_s}{w_s} \cdot 100\% \quad (30)$$

w_m – waga mokrej próbki (po wstępnym osuszeniu) [mg]; w_s – waga próbki po wysuszeniu [mg];

$$[\%] \text{ Ubytek wagi } \Delta m = \frac{w_0 - w_s}{w_0} \cdot 100\% \quad (31)$$

w_0 – waga początkowa frakcji polimeru biodegradowalnego w próbce [mg]; w_s – sucha waga frakcji polimeru biodegradowalnego po degradacji [mg];

Wartość Δm obliczono odejmując wagę frakcji kopoliestru po degradacji od wagi przed degradacją. Najpierw jednak wyznaczono dokładny skład wagowy poszczególnych włókien, a następnie odjęto wagę niedegradowalnej frakcji PCU od wagi próbki przed i po degradacji. W ten sposób uwzględniono jedynie zmiany w obrębie frakcji włókien ulegających degradacji hydrolitycznej. Skład wagowy włókien dwuskładnikowych wyznaczono na drodze selektywnego rozpuszczania biodegradowalnego polimeru za pomocą acetonu. Czynność powtarzano pięciokrotnie a następnie odparowywano rozpuszczalnik do suchej wagi próbki w temperaturze 40 °C przez 48 godzin. Suszono również pozostałości poliuretanowe. Następnie obie frakcje ważono i obliczano dokładne składki włókien.

11.3. Analiza morfologii powierzchni włókien z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz mikroskopii optycznej

Obrazy powierzchni włókien przed, w trakcie oraz po degradacji zarejestrowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Quanta 250 FEG (FEI Company, USA). Stosowano napięcie przyspieszające wynoszące 5 kV oraz warunki wysokiej próżni. Nie przeprowadzono napyłania powierzchni złotem. Przy użyciu oprogramowania ImageJ (National Institutes of Health and Optical and Computational Instrumentation Laboratory, Uniwersytet Wisconsin), na podstawie 50 pomiarów (N=50) wyznaczono średnie wartości średnic włókien.

Do uzyskania obrazów próbek, które nie wymagały dużego powiększenia wykorzystano stereoskopowy mikroskop optyczny (IPOS 810, Delta Optical, Polska).

11.4. Wyznaczanie średnich mas molowych metodą chromatografii wykluczania (żelowej) (SEC/GPC)

Średnie masy molowe oraz dyspersyjność polimerów mierzono metodą chromatografii wykluczania (chromatografii żelowej) (Spectra Physics SP 8800, USA). Podczas degradacji hydrolitycznej analizowano tylko biodegradowalną frakcję włókien. W tym celu została ona oddzielona od nanowłókien PCU poprzez selektywne rozpuszczanie w acetonie. Nierozpuszczony poli(węglano uretan) odwirowano, a powstały roztwór poliestru przeniesiono ilościowo do fiolek i odparowano. Po odparowaniu rozpuszczalnika próbki suszono do stałej wagi pod próżnią (20 mb, 20 °C), a następnie badano z wykorzystaniem detektora współczynnika załamania światła. Pomiar przeprowadzono z szybkością przepływu 1 ml/min, dla roztworów w chloroformie.

11.5. Badanie właściwości termicznych metodą różnicowej kalymetrii skaningowej (DSC)

Zmiany właściwości termicznych badanych włókien podczas procesu degradacji hydrolitycznej badano za pomocą różnicowego kalorymetru skaningowego Q2000 DSC (TA Instruments, USA). Na podstawie drugiego przebiegu krzywej termicznej (po stopieniu, a następnie szybkim schłodzeniu próbek w ciekłym azocie) wyznaczono temperaturę zeszklenia kopoliestrów (T_g). Pomiar prowadzono w zakresie od -80 °C do 200 °C, z szybkością ogrzewania wynoszącą 20 °C/min, w atmosferze azotu przy przepływie gazu 50 mL/min, stosując standardowe tygle aluminiowe. Pomimo tego, że analizowano jedynie zmiany właściwości biodegradowalnego składnika, nie przeprowadzono

ekstrakcji poliestrów, gdyż spowodowałyby to usunięcie historii przetwórczej, którą można odczytać z pierwszego biegu pomiaru DSC. Dane okazały się przydatne, ponieważ umożliwiały obserwację relaksacji materiału przy przejściu szklistym oraz topnienie fazy uporządkowanej, w zależności od rodzaju badanego polimeru.

11.6. Analiza składu molowego oraz mikrostruktury kopoliestrów za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Wykorzystując spektrometrię magnetycznego rezonansu jądrowego wysokiej rozdzielczości (NMR) (spektrometr Advance II Ultrashield Plus, Bruker, USA) otrzymano widma protonowe i węglowe na podstawie których obliczono mikrostrukturę oraz zmiany składu molowego kopoliestrów podczas degradacji hydrolitycznej. Próbki do przeprowadzenia pomiaru rozpuszczano w deuterowanym chloroformie lub dimetylosulfotlenku, w zależności od potrzeb. Widma protonowe (^1H NMR) uzyskano przy częstotliwości rezonansowej wynoszącej 600 MHz, natomiast węglowe (^{13}C NMR) przy 150 MHz. Ze względu na nakładanie się sygnałów pochodzących od kopoliestrów i PCU, w szczególności poliuretanu ChronoSil, składniki włóknin rozdzielono opisaną w Rozdziale 11.2. metodą selektywnego rozpuszczania w acetonie.

11.7. Wyznaczanie profili uwalniania leków za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Profile uwalniania leków wyznaczono na podstawie wyników chromatografii HPLC. Chromatograf (VWR / Hitachi LaChrom Elite, Japonia) składał się z pompy (L-2130), pieca do kolumn (L-2350) i detektora z matrycą diodową (DAD, L-2455). Fazą stacjonarną była kolumna LiChrospher RP-18 (250x4 mm, Merck, Niemcy) i kolumna LiChrospher RP-18 (4x4 mm, Merck, Niemcy). Faza ruchoma składała się z acetonitrylu i wody (60:40), a jej przepływ wynosił 1 ml/min. Analizy przeprowadzono w temperaturze 25 °C dla soli sodowej diklofenaku oraz w 40 °C dla sirolimusu w obecności docetakselu, jako wzorca wewnętrznego, którego stężenie wynosiło 1 µg/ml. W przypadku obu leków analityczna długość fali wynosiła 278 nm. Kinetykę uwalniania mierzono poprzez zbadanie ich pozostałości w matrycy po danym czasie uwalniania. Z tego względu każdy pomiar poprzedzała procedura ekstrakcji leków. Polegała ona na rozpuszczeniu włókniny w 1 ml chlorku metylenu (DCM) a następnie wytrąceniu polimerów za pomocą 4 ml etanolu, który jednocześnie był rozpuszczalnikiem dla leków. Zawiesinę mieszano za pomocą wortexu (Wizard Advanced Vortex Mixer, VELP Scientifica, Włochy), po czym pozostawiano na około 24 godziny, po czym ponownie mieszano za pomocą wortexu a następnie wirowano z prędkością 10 tys. obr./min przez 10 min w wirówce (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Niemcy). Przygotowane w ten sposób próbki badano za pomocą chromatografu HPLC w ilości 3 powtórzeń na każdy punkt czasowy (N=3).

Zdecydowano się na pomiary zawartości leków w matrycy, a nie medium, ze względu na powolny rozkład sirolimusu w środowisku wodnym, co mogłoby zaniżyć uzyskane wyniki [242]. Uwalnianie oceniano na podstawie metody porównania z krzywą kalibracyjną. W tym celu w kolbach miarowych o pojemności 25 ml przygotowano etanolowe roztwory sirolimusu w zakresie stężeń od 0,05 µg/ml do 1,00 mg/ml oraz soli sodowej diklofenaku w zakresie stężeń od 1,00 µg/ml do 1,00 mg/ml. Otrzymano

odpowiednie funkcje liniowe charakteryzujące zależność pomiędzy stężeniem leku, a polem powierzchni sygnału mierzonego przy analitycznej długości fali wynoszącej 278 nm. Wyznaczone metodą regresji liniowej współczynniki determinacji dla uzyskanych funkcji wynosiły odpowiednio $R^2=0,9979$ dla sirolimusu i $R^2=0,9986$ dla soli sodowej diklofenaku.

11.8. Modelowanie matematyczne kinetyki uwalniania leków

Dopasowanie uzyskanych wyników eksperymentalnych do wybranych modeli matematycznych opisujących kinetykę uwalniania leków przeprowadzono za pomocą programu DDSolver, który stanowił darmową wtyczkę do arkusza kalkulacyjnego Excell (Microsoft, USA). Spośród dostępnych modeli wybrano te, które swoimi założeniami w najbardziej odpowiadały badanemu układowi, pozwalając na oszacowanie zależności szybkości uwalniania od czasu oraz etapu limitującego szybkość procesu uwalniania leków. Zostały one zestawione w Tabeli 10. Jako miarę dopasowania danych empirycznych do danego modelu wybrano skorygowany współczynnik determinacji R_{adj}^2 , który jest preferowany w przypadku porównywania modeli o różnej liczbie parametrów (Równanie 32). Założono, że aby uznać dopasowanie modelu za wystarczające (mające fizyczny sens) współczynnik R_{adj}^2 powinien wynosić co najmniej 0,95.

$$R_{adj}^2 = 1 - \frac{n-1}{n-p} \cdot (1 - R^2) \quad (32)$$

gdzie: n – liczba punktów danych; p – liczba parametrów modelu; R^2 – współczynnik determinacji;

Tabela 10. Wykorzystane modele kinetyczne uwalniania leków oraz odpowiadające im funkcje matematyczne

Model kinetyki uwalniania leków	Funkcja
Zerowego rzędu	$F = F_0 + k_0 \cdot t$
Pierwszego rzędu	$F = F_{max} \cdot [1 - e^{-k_1 t}]$
Higuchiego	$F = k_H \cdot \sqrt{t}$
Hixona-Corwella	$F = 100 \cdot [1 - (1 - k_{HC} \cdot t)^3]$
Korsmeyera-Peppasa	$F = k_{KP} \cdot t^n$

gdzie: F – frakcja leku uwolniona w czasie t ; F_0 – początkowa ilość leku w roztworze; F_{max} – maksymalna ilość uwolnionego leku w nieskończonym czasie; k_0 – stała szybkości uwalniania zerowego rzędu; k_1 – stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu; k_H – stała szybkości Higuchiego; k_{HC} – stała szybkości Hixona-Corwella; k_{KP} – stała szybkości Korsmeyera-Peppasa; n – współczynnik uwalniania Korsmeyera-Peppasa;

11.9. Wyznaczanie kąta zwilżania

Kąt zwilżania wodą powierzchni wyjściowych polimerów oraz włóknin zmierzono za pomocą goniometru optycznego (CAM 101, KSV Instruments Ltd., Finlandia). Wykorzystano metodę statycznej kropli siedzącej. Pomiar przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Dla każdej próbki wykonano po 5 pomiarów ($N=5$).

11.10. Wyznaczanie właściwości mechanicznych w statycznej próbie rozciągania

Właściwości mechaniczne włóknin w postaci pasków o wymiarach 10x60 mm, wyciętych z materiału równolegle do kierunku nawijania włókien na kolektor, zmierzono w statycznej próbie rozciągania na maszynie do prób wytrzymałościowych (Instron, Model 4204, USA), wyposażonej w komorę środowiskową. Testy prowadzono w temperaturze 37 °C. Odległość pomiędzy szczękami równą odcinkowi pomiarowemu ustalono na 40 mm, a prędkość rozciągania na 100 mm/s. Próbkę badano przed degradacją oraz po 28 i 84 dniach, za każdym razem pobierając je z roztworu PBS bezpośrednio przed rozciąganiem i kondycjonując przez 10 minut w temperaturze pomiaru. Wyniki uzyskano na podstawie 3 powtórzeń (N=3).

11.11. Badania cytotoksyczności oraz adhezji *in vitro* na fibroblastach

Ludzkie fibroblasty WI-38 (CCL-75) otrzymano z American Type Culture Collection. Komórki hodowano w Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej, 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny w 37 °C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO₂ (Eppendorf, CellXpert-C170i).

Badanie cytotoksyczności przeprowadzono zgodnie z normą ISO 10993-5. W tym celu po 500 µl zawiesiny zawierającej $2,5 \times 10^4$ komórek przeniesiono do dołków płytek 24-dołkowych i hodowano w standardowej pożywce przez 24 godziny w celu zapewnienia adhezji. Po tym czasie w dołkach umieszczono inserty zawierające włókniny w postaci krążków o średnicy 5 mm, a następnie do każdego z nich dodano dodatkowo 500 µl DMEM. Fibroblasty inkubowano wraz z testowanymi próbkami przez 72 godziny. Komórki hodowane w standardowych warunkach zastosowano jako kontrolę negatywną, a komórki potraktowane DMEM zawierającym 5% dimetylosulfotlenku wykorzystano jako kontrolę pozytywną. Żywność oceniano za pomocą testu cytotoksyczności (Cell Counting Kit – 8). Absorbancję mierzono przy 450 nm i 650 nm długości fali odniesienia za pomocą czytnika Spark 10M (Tecan, Szwajcaria). Do analizy statystycznej wyników zastosowano jednokierunkową analizę ANOVA.

W celu zbadania adhezji komórek na powierzchni włóknin w postaci krążków o średnicy 5 mm, próbki przymocowano do dna czarnej 96-dołkowej płytki za pomocą medycznego kleju silikonowego i suszono przez 24 godziny, a następnie wysterylizowano za pomocą strumienia elektronów (15 kGy). Do każdego dołka dodano 150 µl zawiesiny komórek (ludzkie fibroblasty WI-38 CCL-75) ($1,0 \times 10^4$ komórek na dołek), a po czym inkubowano przez 72 godziny. Następnie pożywkę pobrano, a włókniny delikatnie przemyto wodnym roztworem PBS i barwiono kalceiną przez 20 min. Fluorescencję analizowano za pomocą czytnika Spark 10M (Tecan, Szwajcaria).

11.12. Badanie przenikania roztworu modelowego barwnika przez włókniny

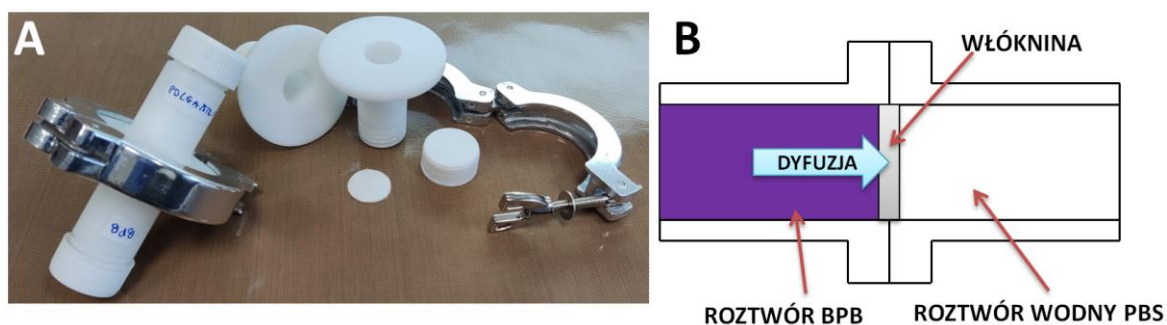
Współczynniki retencji włóknin w czasie inkubacji wyznaczono stosując modelowy barwnik, błękit bromofenolowy (BPB). Wyboru dokonano ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie ($\sim 4 \text{ g/dm}^3$) oraz wielkość cząsteczki nieznacznie mniejszą od sirolimusu. Pomiar przeprowadzono w celu wstępnego oszacowania bezpieczeństwa stosowania sirolimusu, który docelowo powinien uwalniać się z włókniny w określonym kierunku, w jak najmniejszym stopniu oddziałując na regenerujące się

tkanki. Zatem, jego dyfuzja przez wewnętrzną strukturę materiału na drugą stronę powinna być ograniczona, aby nie wywoływać skutków ubocznych. Z tego względu, wykorzystując elektrorozpylenie uformowano rdzeń materiału w postaci poliuretanowej membrany. Stosując stężenie barwnika, znacznie przekraczające iloczyn rozpuszczalności sirolimusu, wytworzono większą siłę napędową dyfuzji, aby mieć pewność skuteczności działania wytworzonej bariery.

Procedura pomiarów była następująca. Rozpuszczając 16,75 mg barwnika w 250 ml wodnego roztworu PBS otrzymano wyjściowy roztwór o stężeniu $0,1 \text{ mmol/dm}^3$, ponad 25-krotnie wyższym od stężenia nasycenia sirolimusu w wodzie. Próbki włóknin w postaci krążków o średnicy 20 mm umieszczono w przygotowanym metodą obróbki skrawaniem CNC naczyniu, którego połówki docisnięto i unieruchomiono za pomocą obejm zaciskowej, tworząc szczelne połączenie obu elementów (Rys. 18). Do jednej z komór (pomiarowej) wprowadzono 10 ml wodnego roztworu PBS, a do drugiej roztwór BPB. Po zamknięciu komór, próbki inkubowano w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Podczas eksperymentu obserwowano, jak szybko dojdzie do wyrównania stężeń roztworu BPB pomiędzy dwoma komorami, oddzielonymi włókniną. Stężenie początkowe roztworu BPB wynosiło $100 \text{ } \mu\text{mol/l}$, z tego względu maksymalne stężenie barwnika w komorze pomiarowej urządzenie dążyło do wartości $50 \text{ } \mu\text{mol/l}$. Obserwacje prowadzono przez 84 dni (tak długo jak, uwalnianie leków). Ilość barwnika, który przedostał się do komory pomiarowej badano metodą spektrofotometrii UV-VIS (Tecan, Spark 10M, Szwajcaria), przy analitycznej długości fali wynoszącej 591 nm (maksimum absorpcji BPB). W eksperymencie wykorzystano tylko te próbki, które zawierały w swoim składzie oba leki w ilości po 5% wag., a matryca została wytworzona z roztworów w DCM. Na podstawie wartości stężeń w roztworze BPB (roztwór nadawy) oraz czystym roztworze PBS obliczono jak zmieniał się współczynnik retencji (R) (Równanie 33) każdej z włóknin, w czasie prowadzenia obserwacji.

$$R = \frac{C_N - C_P}{C_N} = 1 - \frac{C_P}{C_N} \quad (33)$$

gdzie: C_N – stężenie BPB w nadawie; C_P – stężenie BPB w permeacie;



Rys. 18. Zdjęcie przedstawiające naczynie wraz ze sposobem umieszczenia w nim próbek (A) oraz schemat przedstawiający zasadę pomiaru (B)

12. Charakterystyka wykorzystanych polimerów i leków

12.1. Poli(D,L-laktyd-co-glikolid) (PDLGA)

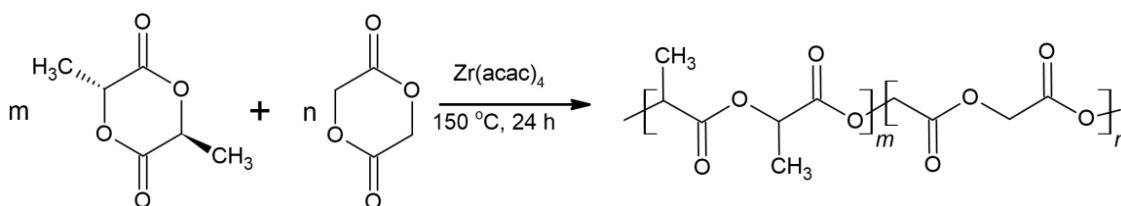
PLGA jest biodegradowalnym kopoliolesterem, który wykorzystano w badaniach w roli matrycy (nośnika) uwalniającego leki (*Eksperyment 1 i 2*). Został on otrzymany w reakcji polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROP) D,L-laktydu i glikolidu (Rys. 19). W syntezie zastosowano metaloorganiczny, nietoksyczny inicjator w postaci acetyloacetonianu cyrkonu (IV) $(Zr(acac)_4)$ [243, 244]. Reakcję prowadzono w 150 °C przez 24 godziny. Stosunek molowy inicjatora do sumy moli monomerów wynosił 1:1000. Po syntezie polimer oczyszczono z nieprzereagowanego D,L-laktydu poprzez rozpuszczenie w chloroformie a następnie wytrącenie w metanolu. Otrzymany materiał suszono pod obniżonym ciśnieniem (20 mb w temperaturze 20 °C) przez miesiąc. Metodą spektroskopii NMR (1H NMR) wyznaczono rzeczywisty skład molowy kopolimeru wynoszący 79:21% mol jednostek laktydylowych do jednostek glikolidylowych (Równania 34 i 35). Z teoretycznych i eksperymentalnych wartości średniej długości bloków laktydylowych (odpowiednio L_{LL}^R 2,88 i L_{LL}^e 5,53) oraz glikolidylowych (odpowiednio L_{GG}^R 0,77 i L_{GG}^e 1,47), za pomocą Równania 36 obliczono współczynnik randomizacji, wynoszący $R=0,52$, co świadczyło o semiblokowej mikrostrukturze PDLGA [245, 246]. Widma protonowe i węglowe, na podstawie których dokonano obliczeń, przedstawiono na Rys. 20 i Rys. 21. Za pomocą chromatografii GPC wyznaczono średnie masy molowe PDLGA. w analizie DSC zbadano właściwości termiczne a przy użyciu goniometru optycznego sprawdzono kąt zwilżania wodą powierzchni polimeru (Tabela 11).

$$C_{LA}[\%] = \frac{I_{CH(1)}}{\frac{I_{CH2(2)}}{2} + I_{CH(1)}} \cdot 100 \quad (34)$$

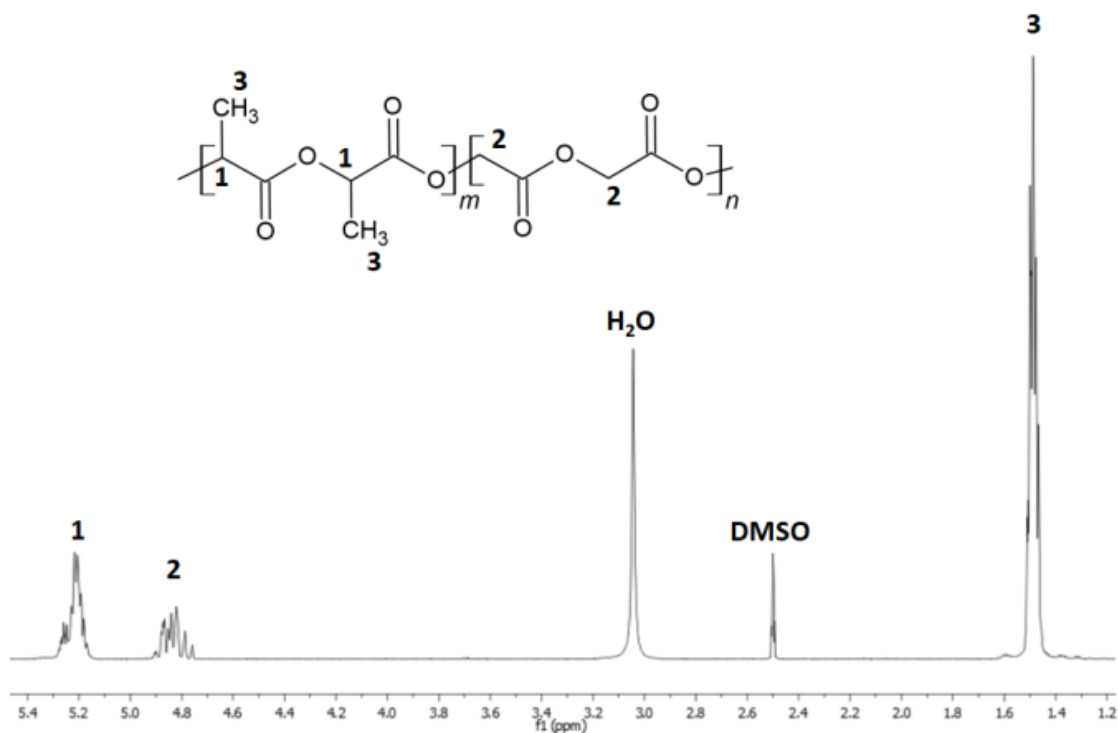
$$C_{GL}[\%] = \frac{\frac{I_{CH2(2)}}{2}}{\frac{I_{CH2(2)}}{2} + I_{CH(1)}} \cdot 100 \quad (35)$$

gdzie: I_{CH} - pole pod pikiem odpowiadającym sygnałowi grupy CH; I_{CH2} - pole pod pikiem odpowiadającym sygnałowi grupy CH_2 ;

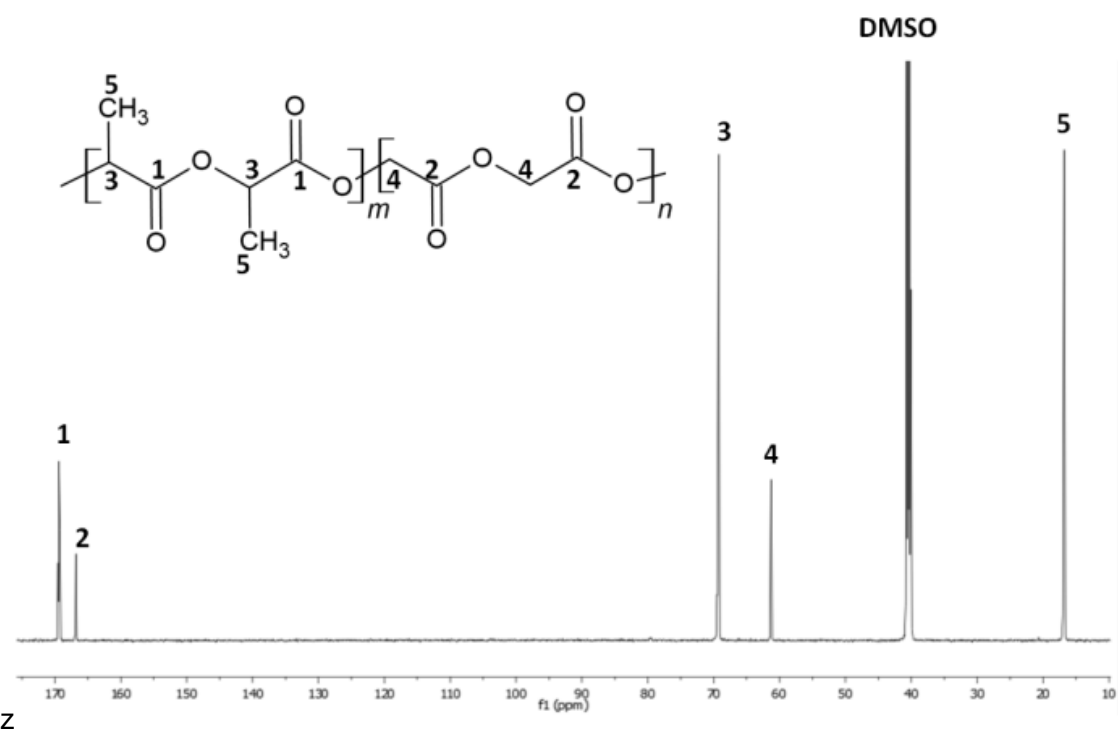
$$R = \frac{L_{LL}^R}{L_{LL}^e} = \frac{L_{GG}^R}{L_{GG}^e} \quad (36)$$



Rys. 19. Schematyczne przedstawienie reakcji kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia D,L-laktydu i glikolidu



Rys. 20. Widmo protonowe ^1H NMR (600 MHz) kopoliestru PDLGA wykonane w DMSO-D6



Rys. 21 Widmo węglowe ^{13}C NMR (150 MHz) kopoliestru PDLGA wykonane w DMSO-D6

12.2. Poli(ϵ -kapolakton-co-węglan trimetyleny) (PCLTMC)

PCLTMC jest biodegradowalnym poli(estro-węglanem), który wykorzystano w badaniach, jako matrycę uwalniającą leki (*Eksperyment 3*). Kopolimer otrzymano w procesie polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROP) ϵ -kapolaktonu i węglanu trimetyleny, przy zastosowaniu metaloorganicznego,

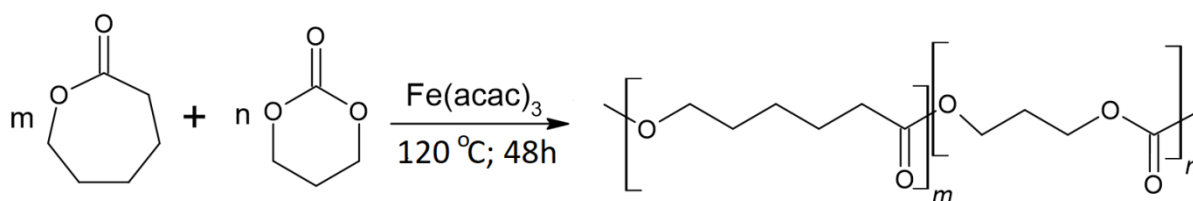
nietoksycznego inicjatora w postaci acetyloacetonianu żelaza (III) ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) (Rys. 22). Reakcję prowadzono w $120\text{ }^\circ\text{C}$ przez 48 godzin [247]. Po syntezie polimer oczyszczono z nieprzereagowanych monomerów poprzez rozpuszczenie w chloroformie, a następnie wytrącenie w metanolu. Otrzymany materiał suszono przez miesiąc pod zmniejszonym ciśnieniem (20 mb, $20\text{ }^\circ\text{C}$). Stosunek molowy inicjatora do sumy moli monomerów wyniósł 1:600. Rzeczywisty skład molowy równy 40:60% mol jednostek ϵ -kaproilowych do jednostek węglanowych, wyznaczono na podstawie widm ^1H NMR stosując Równanie 37 i Równanie 38. Za pomocą Równania 39 obliczono współczynnik randomizacji, wynoszący $R=0,99$, co świadczyło o niemal całkowicie przypadkowym (randomowym), wzajemnym ułożeniu mikrobloków w kopolimerze PCLTMC będącym skutkiem reakcji transestryfikacji. Został on wyznaczony na podstawie stosunku teoretycznych i eksperymentalnych wartości średniej długości jednostek węglanowych (odpowiednio $L_{\text{TMC}}^{\text{R}}$ 2,50 i $L_{\text{TMC}}^{\text{e}}$ 2,52) oraz ϵ -kaproilowych (odpowiednio L_{CL}^{R} 1,67 i L_{CL}^{e} 1,68), według metody opisanej przez Pastusiak *et al.* [248]. Widma protonowe i węglowe, na podstawie których dokonano obliczeń przedstawiono na Rys. 23 i Rys. 24. Za pomocą chromatografii GPC wyznaczono średnie masy molowe PCLTMC, w analizie DSC zbadano właściwości termiczne a przy użyciu goniometru optycznego sprawdzono kąt zwilżania wodą powierzchni polimeru (Tabela 11).

$$C_{\text{TMC}}[\%] = \frac{\frac{I_{\text{CH2}(4)}}{2}}{\frac{I_{\text{CH2}(4)}}{2} + \frac{I_{\text{CH2}(5)}}{2}} \cdot 100 = \frac{I_{\text{CH2}(4)}}{I_{\text{CH2}(4)} + I_{\text{CH2}(5)}} \cdot 100 \quad (37)$$

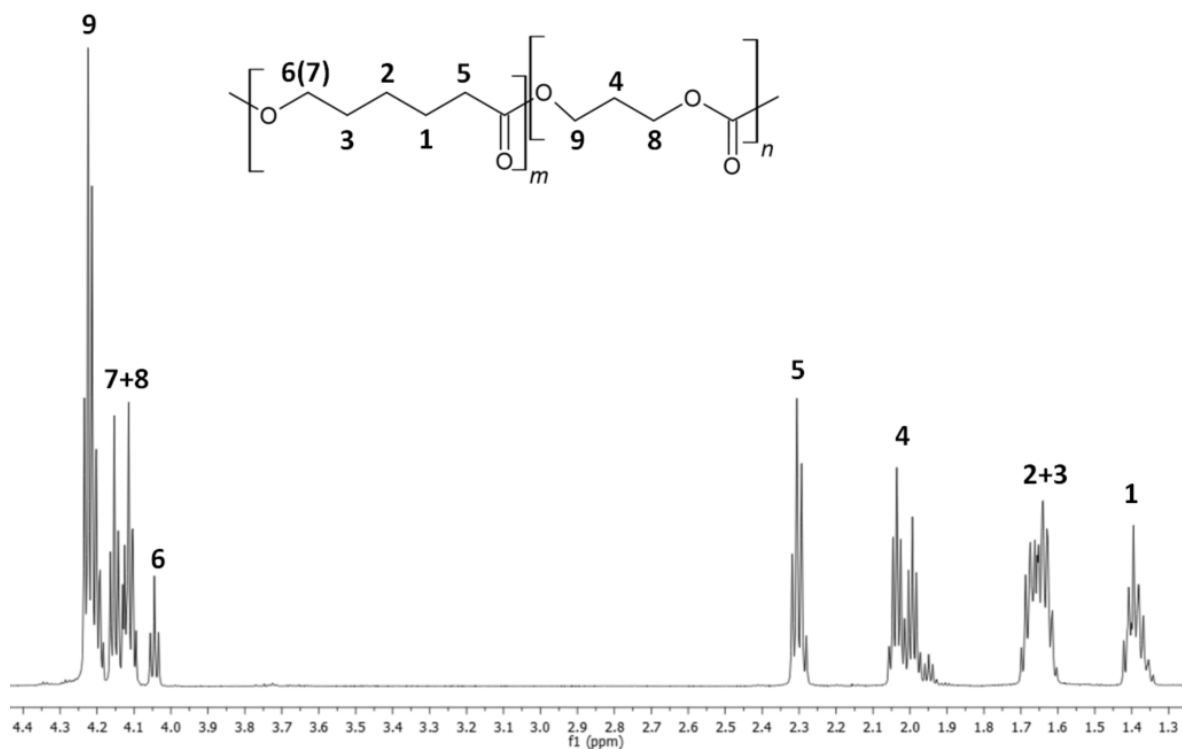
$$C_{\text{CL}}[\%] = \frac{\frac{I_{\text{CH2}(5)}}{2}}{\frac{I_{\text{CH2}(4)}}{2} + \frac{I_{\text{CH2}(5)}}{2}} \cdot 100 = \frac{I_{\text{CH2}(5)}}{I_{\text{CH2}(4)} + I_{\text{CH2}(5)}} \cdot 100 \quad (38)$$

gdzie: $I_{\text{TMC}+\text{TMC}}$ - pole pod pikiem odpowiadającym diadzie TMC-TMC; $I_{\text{TMC}+\text{CL}}$ - pole pod pikiem odpowiadającym diadzie TMC-CL; $I_{\text{CL}+\text{TMC}}$ - pole pod pikiem odpowiadającym diadzie CL-TMC; $I_{\text{CL}+\text{CL}}$ - pole pod pikiem odpowiadającym diadzie CL-CL;

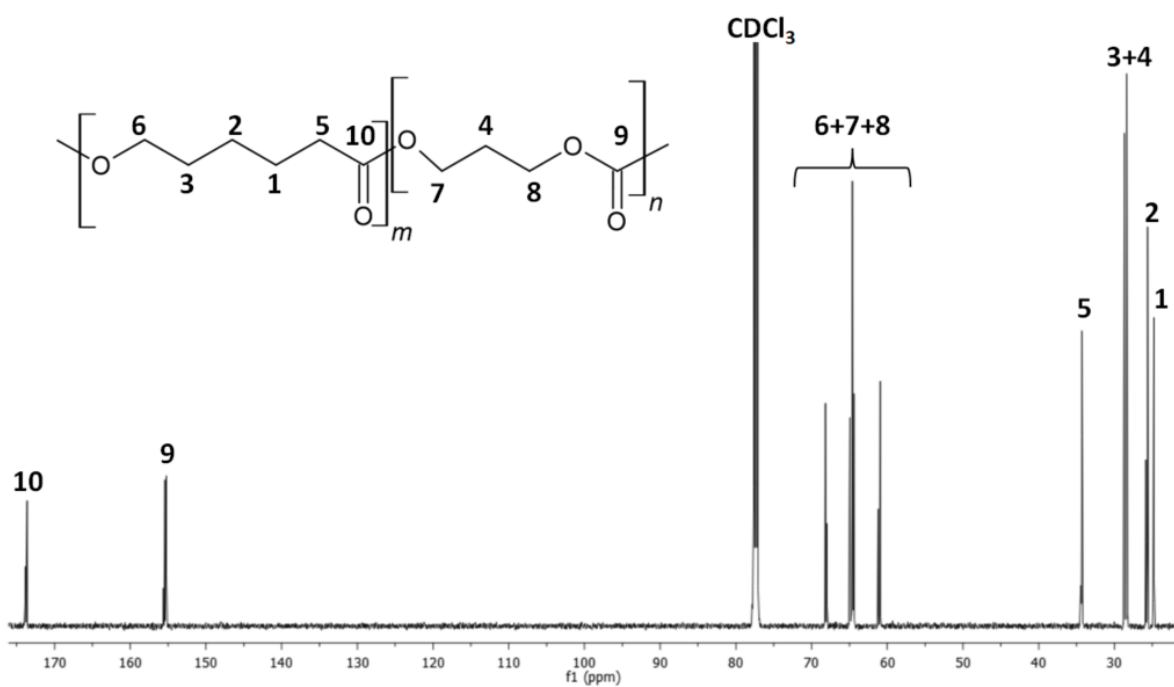
$$R = \frac{L_{\text{TMC}}^{\text{R}}}{L_{\text{TMC}}^{\text{e}}} = \frac{L_{\text{CL}}^{\text{R}}}{L_{\text{CL}}^{\text{e}}} \quad (39)$$



Rys. 22. Schematyczne przedstawienie reakcji kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia ϵ -kaprolaktonu i węglanu trimetylenu



Rys. 23. Widmo protonowe ^1H NMR (600 MHz) kopoliestru PCLTMC o składnie molowym 40:60% mol jednostek ϵ -kaproilowych do węglanowych wykonane w deuterowanym chloroformie.



Rys. 24. Widmo węglowe ^{13}C NMR (150 MHz) kopoliestru PCLTMC o składnie molowym 40:60% mol jednostek ϵ -kaproilowych do węglanowych wykonane w deuterowanym chloroformie

12.3. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)

PCL jest biodegradowalnym, semikrystalicznym poliestrem biodegradowalnym, który wykorzystano w badaniach jako stabilizator włókien PCLTMC. Za pomocą zwiększenia stopnia krystaliczności materiału, uzyskano lepszą jakość włókniny oraz stabilność jej struktury w początkowym etapie inkubacji. Za pomocą chromatografii GPC wyznaczono średnie masy molowe PCL, w analizie DSC zbadano właściwości termiczne a przy użyciu goniometru optycznego sprawdzono kąt zwilżania wodą powierzchni polimeru (Tabela 11).

Tabela 11. Wybrane właściwości wyjściowe polimerów biodegradowalnych wykorzystanych w badaniach

Polimer	Mn [g/mol]	Mw [g/mol]	Đ [-]	T _g [°C]	Θ _c [°]
PDLGA	45 000	89 000	1,98	54	74,7±1,2
PCLTMC	71 000	148 000	2,08	-38	91,1±1,2
PCL	32 000	65 000	2,03	-65	112,0±1,0

Mn – liczbowa średnia masa molowa; Mw – wagowo średnia masa molowa; Đ – dyspersyjność; T_g – temperatura zeszklenia; Θ_c – kąt zwilżania wodą;

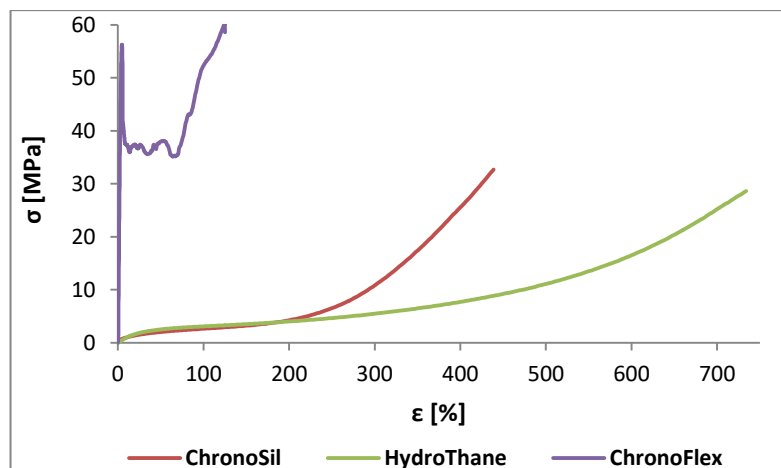
12.4. Poli(węglano uretany) (PCU)

Dostępne handlowo poli(węglano uretany), zostały wykorzystane w formie elektroprzędzonych nanowłókien, jako modyfikatory szybkości degradacji matrycy i uwalniania leków oraz stabilizatory właściwości mechanicznych włókien. Każdy z wybranych materiałów spełniał standardy USP (*ang. United States Pharmacopeia*) Klasy VI, świadczące o ich biogodności [249, 250, 251]. Poniżej przedstawiono ich krótką charakterystykę, w Tabeli 12 zestawiono podstawowe parametry a na Rys. 25 krzywe rozciągania.

ChronoSil®AL80A5% jest to alifatyczny, hydrofobowy, termoplastyczny elastomer poliuretanowy o niskiej temperaturze zeszklenia. Produkuje się go z heksametylenodiizocyjanianu (HDI) oraz poliwęglanodioliu, dodatkowo zawiera on w swojej strukturze 5% mol. poli(dimetylosiloksanu) (PDMS). W dalszej części pracy stosowano w skróconą nazwę tego polimeru w formie ChronoSil lub Sil (na wykresach i w tabelach).

HydroThane™AR2580A jest to aromatyczny, hydrofilowy i higroskopijny, termoplastyczny elastomer poliuretanowy o niskiej temperaturze zeszklenia, wykazujący tendencję absorpcji do 20 % wag. wody. Produkuje się go z 4,4'-metyleno difenylo-diizocyjanianu (MDI) i poliwęglanodioliu. W dalszej części pracy stosowano w skróconą nazwę tego polimeru w formie HydroThane lub Thane (na wykresach i w tabelach).

ChronoFlex®AL75D jest to alifatyczny, hydrofilowy, termoplastyczny elastomer poliuretanowy o wysokiej temperaturze zeszklenia, mniej elastyczny, o wyższej wytrzymałości mechanicznej niż dwa pozostałe. Produkuje się go z heksametylenodiizocyjanianu (HDI) oraz poliwęglanodioliu. W dalszej części pracy stosowano w skróconą nazwę tego polimeru w formie ChronoFlex lub Flex (na wykresach i w tabelach).



Rys. 25. Przykładowe krzywe zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ) poliuretanów w postaci pasków folii o wymiarach 10 x 60 mm i grubości $598 \pm 82 \mu\text{m}$, wyznaczone w statycznej próbie rozciągania

Tabela 12. Wybrane właściwości poliuretanów wykorzystanych w badaniach

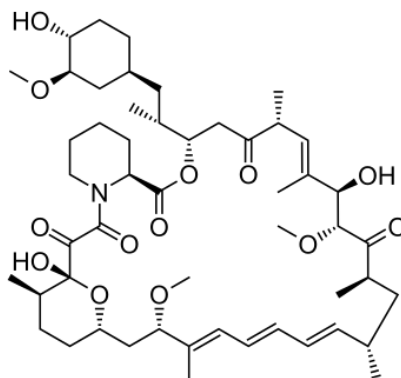
Polimer	Mn [g/mol]	Mw [g/mol]	\bar{D} [-]	T_g [°C]	Θ_c [°]
ChronoSil	84 000	183 000	2,18	-30	$105,6 \pm 2,9$
HydroThane	71 000	139 000	1,96	-4	$81,9 \pm 0,9$
ChronoFlex	82 000	178 000	2,17	58	$69,0 \pm 2,4$

Mn – liczbowo średnia masa molowa; Mw – wagowo średnia masa molowa; \bar{D} – dyspersyjność; T_g – temperatura zeszklenia; Θ_c – kąt zwilżania wodą;

12.5. Leki

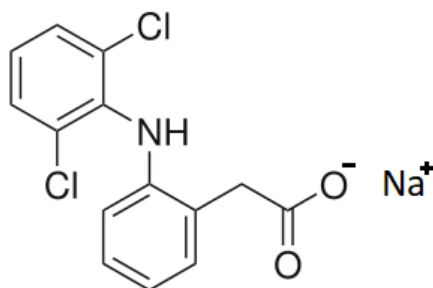
Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę substancji aktywnych wybranych do realizacji badań ze względu na znaczne różnice we właściwościach fizycznych i chemicznych oraz działaniu biologicznym, które może potencjalnie znaleźć zastosowanie w leczeniu przepuklin.

Sirolimus (rapamycyna) jest to makrocykliczny lakton pochodzenia naturalnego wykazujący działanie, immunosupresyjne, antyproliferacyjne, przeciwrzybicze i hamujące aktywność limfocytów. Jest to lek hydrofobowy i trudno rozpuszczalny w wodzie [252]. W dalszej części pracy stosowano w skróconą nazwę tego leku w formie SLM. Jego strukturę chemiczną przedstawiono na Rys. 26 a podstawowe właściwości fizyczne w Tabeli 13.



Rys. 26. Struktura chemiczna sirolimusu (rapamycyny)

Sól sodowa diklofenaku jest to rozpuszczalna w wodzie pochodna kwasu fenyllooctowego, niesteroidowy lek przeciwbólowy, przeciwzapalny [253]. Dzięki jonowej budowie jest dobrze rozpuszczalny w wodzie. W dalszej części pracy stosowano skróconą nazwę tego leku w formie DiNa. Jego strukturę chemiczną przedstawiono na Rys. 27 a podstawowe właściwości fizyczne w Tabela 13.



Rys. 27. Struktura chemiczna soli sodowej diklofenaku

Tabela 13. Wybrane właściwości leków wykorzystanych w badaniach

Lek	M [g/mol]	r [mg/cm ³]	T _g [°C]	T _m [°C]
Sirolimus (rapamycyna)	914,2	0,0026	40	183-185
Sól sodowa diklofenaku	318,1	21,44	-54	285-287

M – masa molowa; r – rozpuszczalność w wodzie w 20 °C; T_g – temperatura zeszklenia; T_m – temperatura topnienia;

13. Otrzymywanie włókien metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia

Na potrzeby niniejszej pracy stosowano następujący sposób oznaczania poszczególnych włókien:

Kopoliester(matryca)/Poliuretan(PCU)/Stężenie wagowe leków w matrycy/Rozpuszczalnik

Przykładowo: PDLGA/Sil/0/H – oznacza włókninę PDLGA, zmodyfikowaną nanowłóknami ChronoSilu, bez leków i otrzymaną z roztworu w HFIP, a PCLTMC:PCL/5/D – oznacza włókninę PCLTMC:PCL, niezawierającą modyfikatora, do której wprowadzono po 5% wag. SLM i DiNa, otrzymaną z roztworu w DCM. Początkowa zawartość sirolimusu w danej włókninie w każdym z przypadków była równa ilości soli sodowej diklofenaku.

13.1. Otrzymywanie włókien PDLGA/PCU

Wszystkie roztwory wykorzystane podczas elektroprzędzenia, zostały przygotowane wg tej samej procedury. Do odważonej ilości polimeru dodawano rozpuszczalnik, w celu uzyskania uprzednio zoptymalizowanego pod kątem otrzymania włókien stężenia. Leki wprowadzano do matrycy poprzez ich rozpuszczenie w docelowej objętości rozpuszczalnika, a następnie dodanie odpowiedniej ilość polimeru, w celu uzyskania założonego stosunku wagowego tych komponentów przy odpowiednim stężeniu roztworu. Zastosowanymi rozpuszczalnikami dla PDLGA były 1,1,1,3,3,3-heksafluoroizopropanol (HFIP) oraz chlorek metylenu (DCM), natomiast w przypadku poliuretanów wykorzystano N,N-dimetyloacetamid (DMAc). Podsumowanie składów przygotowanych roztworów zestawiono w Tabeli 14. Wszystkie stężenia przedstawiono w procentach wagowych (% wag.). Ilość wprowadzonego leku odnosiła się do jego stężenia procentowego (% wag.) w matrycy PDLGA.

Tabela 14. Składy wagowe roztworów oraz parametry procesu elektroprzędzenia i elektrorozpylenia

Polimer	Stężenie C _p [%]	Rozpuszczalnik	Lek	Ilość leku [%]	U(+) [kV]	U(-) [kV]	h [cm]	Typ głowicy
PDLGA	15	HFIP	brak	-	13	-4,5	17	1xG20
PDLGA	15	HFIP	SLM	5	13	-4,5	17	1xG20
PDLGA	15	HFIP	SLM	10	13	-4,5	17	1xG20
PDLGA	15	HFIP	DiNa	5	13	-4,5	17	1xG20
PDLGA	15	HFIP	DiNa	10	13	-4,5	17	1xG20
PDLGA	15	DCM	brak	-	13	-4,5	17	1xG20
PDLGA	15	DCM	SLM	5	13	-4,5	17	1xG20
PDLGA	15	DCM	DiNa	5	13	-4,5	17	1xG20
ChronoSil	18/6*	DMAc	brak	-	13	-4,5	13	5xG23
HydroThane	21/6*	DMAc	brak	-	13	-4,5	13	5xG23
ChronoFlex	18/6*	DMAc	brak	-	13	-4,5	13	5 xG23

*stężenie roztworów PCU do elektrorozpylenia; C_p – stężenie procentowe polimeru w roztworze; U(+) – wartość napięcia przyłożonego do dyszy przędzalniczej; U(-) – wartość napięcia przyłożonego do kolektora włókien; h – dystans pomiędzy dyszą przędzalniczą a odbieralnikiem; G20 – dysza o średnicy wewnętrznej 0,62 mm; G23 – dysza o średnicy wewnętrznej 0,33 mm;

Przygotowane roztwory wykorzystano w procesie dwustrumieniowego elektroprzędzenia, w celu otrzymania częściowo biodegradowalnych włókien uwalniających leki, w których rolę nieulegającego biodegradacji modyfikatora pełniły nanowłókna PCU. Przeprowadzono również klasyczne elektroprzędzenie, podczas którego przetwarzano tylko jeden rodzaj roztworu, w celu wytworzenia niezmodyfikowanych materiałów odniesienia. Parametry elektroprzędzenia poszczególnych roztworów polimerowych zestawiono w Tabeli 14. Strukturę gradientowego przeplotu mikrowłókien PDLGA oraz nanowłókien PCU otrzymano, stosując zmienną w czasie szybkość dozowania roztworów polimerowych. Szczegółowe zmiany ich objętościowego natężenia przepływu podczas elektroprzędzenia przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Zmiany szybkości dozowania \dot{V} poszczególnych roztworów podczas elektroprzędzenia

Roztwór	Etap I (8h) Elektroprzędzenie dwustrumieniowe \dot{V} [ml/h]	Etap II* (2h) Elektrozpylenie poliuretanu \dot{V} [ml/h]	Etap III (8h) Elektroprzędzenie dwustrumieniowe \dot{V} [ml/h]
PDLGA w HFIP/DCM	od 1.00 do 0.00	-	od 0.00 do 1.00
PDLGA/SLM w HFIP/DCM	od 1.00 do 0.00	-	od 0.00 do 1.00
PDLGA/DiNa w HFIP/DCM	od 1.00 do 0.00	-	od 0.00 do 1.00
ChronoSil w DMAc	od 0.00 do 0.93	1 = const.	od 0.93 do 0.00
HydroThane w DMAc	od 0.00 do 0.84	1 = const.	od 0.84 do 0.00
ChronoFlex w DMAc	od 0.00 do 0.93	1 = const.	od 0.93 do 0.00

* Etap II rozpoczynano w 7 h trwania Etapu I i kończono po 1 h trwania etapu III (etap pośredni).

Dzięki prowadzeniu elektroprzędzenia ze zmiennymi szybkościami dozowania poszczególnych roztworów, uzyskano nie tylko przeplot dwóch frakcji włókien, lecz również ich gradientowy rozkład wewnątrz objętości włókniiny. Wzajemny stosunek wartości objętościowego natężenia przepływu roztworów został dobrany w ten sposób, aby zewnętrzne regiony materiału zawierały głównie włókna PDLGA z lekami – sirolimus z jednej strony próbki, a sól sodową diklofenaku z drugiej. Miały one zatem pełnić rolę systemu kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych. Udział wagowy mikrowłókien biodegradowalnych ze względu na malejącą w czasie szybkość dozowania zmniejszał się w kierunku środka włókniiny na korzyść poliuretanu, którego zawartość rosła. Rdzeń włókniiny składał się wyłącznie z PCU i miał stanowić mechaniczne wzmocnienie oraz warstwę ograniczającą dyfuzję wewnętrzną leków z jednej strony materiału na drugą (Rys. 17). Makroskopowo, stosunek wagowy kopoliestru do poliuretanu w otrzymanych włókninach wynosił 60:40 ($\pm 2\%$ wag.).

Sumarycznie, na tym etapie otrzymano 17 włókien, zawierających biodegradowalne mikrowłókna PDLGA jako matrycę uwalniającą leki. Spośród nich, w 9 nośnik substancji aktywnej elektroprzędzono z roztworów w HFIP. Materiały te zostały zbadane w *Eksperymencie 1*, z którego wyciągnięte wnioski zostały zastosowane w dalszej części pracy. Kolejne 8 włókien zawierających PDLGA były elektroprzędzone z roztworów w DCM i zostały przebadane w *Eksperymencie 2*. Składy materiałów wykorzystanych na poszczególnych etapach pracy przedstawiono w Tabeli 16 oraz Tabeli 17.

Tabela 16. Składy włókien PDLGA/PCU otrzymanych w *Eksperymencie 1*

Lp.	Oznaczenie	Polimer biodegradowalny	Rozpuszczalnik	Modyfikator	[%] SLM = [%] DiNa (w stosunku do PDLGA)
1	PDLGA/0/H	PDLGA	HFIP	brak	0
2	PDLGA/5/H	PDLGA	HFIP	brak	5
3	PDLGA/10/H	PDLGA	HFIP	brak	10
4	PDLGA/Sil/0/H	PDLGA	HFIP	ChronoSil	0
5	PDLGA/Sil/5/H	PDLGA	HFIP	ChronoSil	5
6	PDLGA/Sil/10/H	PDLGA	HFIP	ChronoSil	10
7	PDLGA/Thane/0/H	PDLGA	HFIP	HydroThane	0
8	PDLGA/Thane/5/H	PDLGA	HFIP	HydroThane	5
9	PDLGA/Thane/10/H	PDLGA	HFIP	HydroThane	10

Tabela 17. Składy włókien PDLGA/PCU otrzymanych w *Eksperymencie 2*

Lp.	Oznaczenie	Polimer biodegradowalny	Rozpuszczalnik	Modyfikator	[%] SLM = [%] DiNa (w stosunku do PDLGA)
1	PDLGA/0/D	PDLGA	DCM	brak	0
2	PDLGA/5/D	PDLGA	DCM	brak	5
3	PDLGA/Sil/0/D	PDLGA	DCM	ChronoSil	0
4	PDLGA/Sil/5/D	PDLGA	DCM	ChronoSil	5
5	PDLGA/Thane/0/D	PDLGA	DCM	HydroThane	0
6	PDLGA/Thane/5/D	PDLGA	DCM	HydroThane	5
7	PDLGA/Flex/0/D	PDLGA	DCM	ChronoFlex	0
8	PDLGA/Flex/5/D	PDLGA	DCM	ChronoFlex	5

13.2. Otrzymywanie włókien PCLTMC:PCL/PCU

Wszystkie roztwory niezbędne do przeprowadzenia procesu elektroprzędzenia zostały przygotowane wg procedury opisanej w Rozdziale 13.1. Wykorzystanym rozpuszczalnikiem dla PCLTMC i PCL był DCM, natomiast w przypadku poliuretanów ponownie użyto DMAc. Podsumowanie składów przygotowanych roztworów zestawiono w Tabeli 18. Wszystkie stężenia przedstawiono w procentach wagowych (% wag.). Ilość wprowadzonego leku odnosiła się do jego stężenia procentowego (% wag.) w matrycy.

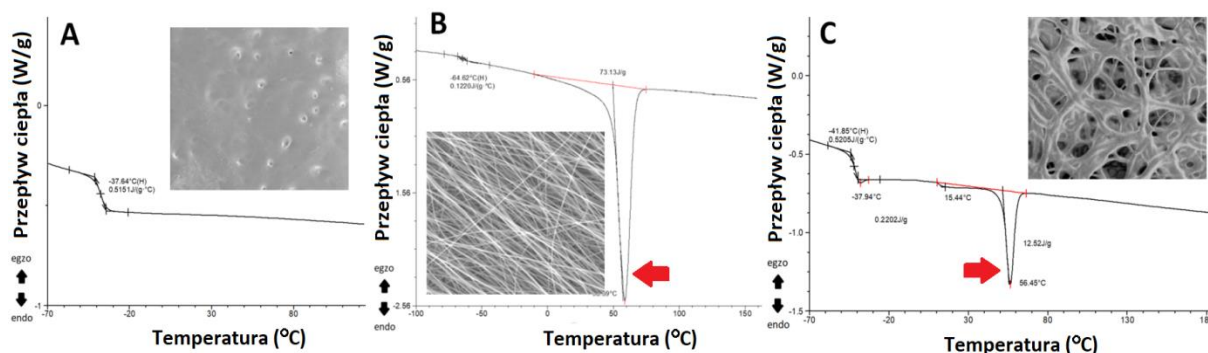
W przypadku roztworów PCLTMC zastosowano stabilizator włókien w postaci dodatku 10 % wag. homopolimeru PCL, w celu wytworzenia niewielkiej zawartości struktury krystalicznej we włóknach. Niska wartość temperatury zeszklenia (-39 °C) oraz amorficzna struktura samego kopolimeru uniemożliwia otrzymanie mikrowłókien w temperaturze pokojowej, ponieważ bez dodatkowej stabilizacji ulegały one zlewaniu się tworząc folię (płynięcie lepkosprężyste polimeru). Zatem, w celu wytworzenia włókien zawierających PCLTMC przygotowano mieszaninę polimerową PCLTMC:PCL o wzajemnym stosunku wagowym 90:10. Wprowadzenie PCL spowodowało wytworzenie niewielkiej ilości fazy krystalicznej, która zapobiegła natychmiastowej utracie struktury włókniny. Była ona jednak dużo bardziej zwarta niż w przypadku PDLGA (Rys. 28).

Tabela 18. Składy wagowe roztworów oraz parametry procesu elektroprzędzenia i elektrorozpylenia

Polimer	Stabilizator	Stężenie C _p [%]	Rozpuszczalnik	Lek	Ilość leku [%]	U(+) [kV]	U(-) [kV]	h [cm]	Typ głowicy
PCLTMC	10% PCL	12	DCM	brak	-	13	-4,5	17	1xG20
PCLTMC	10% PCL	12	DCM	SLM	5	13	-4,5	17	1xG20
PCLTMC	10% PCL	12	DCM	DiNa	5	13	-4,5	17	1xG20
ChronoSil	brak	18/6*	DMAc	brak	-	13	-4,5	10	5xG23
HydroThane	brak	21/6*	DMAc	brak	-	13	-4,5	10	5xG23
ChronoFlex	brak	18/6*	DMAc	brak	-	13	-4,5	10	5xG23

*stężenie roztworów PCU do elektrorozpylenia; C_p – stężenie procentowe polimeru w roztworze; U(+) – wartość napięcia przyłożonego do dyszy przędzalniczej; U(-) – wartość napięcia przyłożonego do kolektora włókien; h – dystans pomiędzy dyszą przędzalniczą a odbieralnikiem; G20 – dysza o średnicy wewnętrznej 0,62 mm; G23 – dysza o średnicy wewnętrznej 0,33 mm;

Przygotowane roztwory wykorzystano w procesie dwustrumieniowego elektroprzędzenia, w celu otrzymania częściowo biodegradowalnych włókien uwalniających leki, w których rolę nieulegającego biodegradacji modyfikatora pełniły nanowłókna PCU. Przeprowadzono również klasyczne elektroprzędzenie, podczas którego przetwarzano tylko jeden rodzaj roztworu, w celu wytworzenia niezmodyfikowanych materiałów odniesienia. Próbkę niezawierającą leków posłużyły do oceny szybkości degradacji hydrolytycznej, natomiast te, które je zawierały wykorzystano do wyznaczenia profilu uwalniania. Parametry elektroprzędzenia poszczególnych roztworów polimerowych zestawiono w Tabeli 18.



Rys. 28. Porównanie właściwości termicznych oraz morfologii powierzchni włókien otrzymanych z PCLTMC (A), PCL (B) oraz mieszaniny PCLTMC:PCL 90:10 (C); strzałkami zaznaczono endotermie topnienia fazy krystalicznej PCL

Strukturę gradientowego przeplotu mikrowłókien PCLTMC:PCL oraz nanowłókien PCU otrzymano, stosując zmienną w czasie szybkość dozowania roztworów polimerowych. Szczegółowe zmiany objętościowego natężenia przepływu poszczególnych roztworów w czasie elektroprzędzenia przedstawiono w Tabeli 19.

Tabela 19. Zmiany szybkości dozowania \dot{V} poszczególnych roztworów podczas elektroprzędzenia

Roztwór	Etap I (8h) Elektroprzędzenie dwustrumieniowe \dot{V} [ml/h]	Etap II* (2h) Elektrorozpylenie poliuretanu \dot{V} [ml/h]	Etap III (8h) Elektroprzędzenie dwustrumieniowe \dot{V} [ml/h]
PCLTMC:PCL w DCM	od 1.60 do 0.00	-	od 0.00 do 1.60
PCLTMC:PCL/SLM w DCM	od 1.60 do 0.00	-	od 0.00 do 1.60
PCLTMC:PCL/DiNa w DCM	od 1.60 do 0.00	-	od 0.00 do 1.60
ChronoSil w DMAc	od 0.00 do 0.93	1 = const.	od 0.93 do 0.00
HydroThane w DMAc	od 0.00 do 0.84	1 = const.	od 0.84 do 0.00
ChronoFlex w DMAc	od 0.00 do 0.93	1 = const.	od 0.93 do 0.00

* Etap II rozpoczynano w 7 h trwania Etapu I i kończono po 1 h trwania etapu III (etap pośredni);

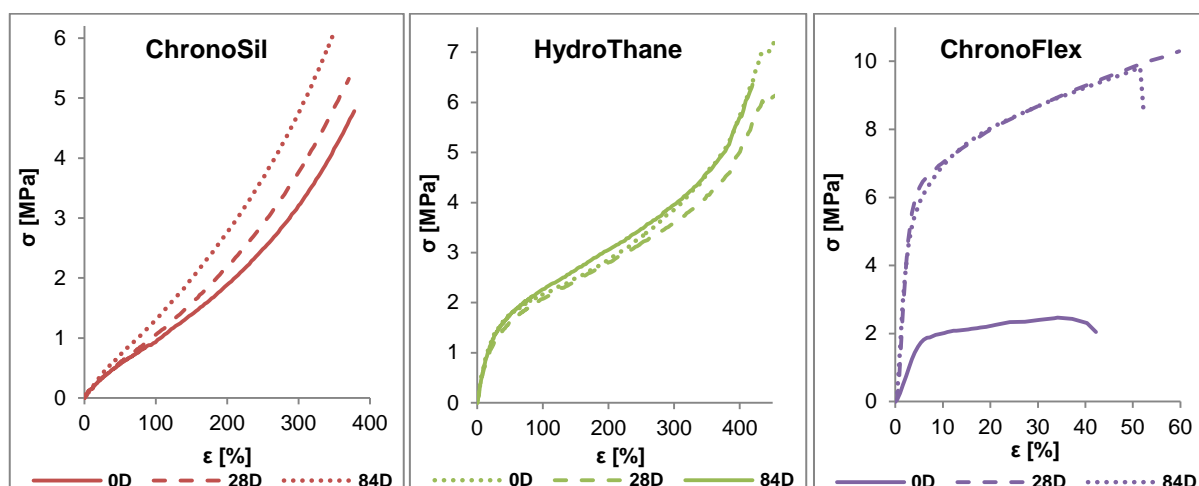
Dzięki prowadzeniu procesu elektroprzędzenia ze zmiennymi szybkościami dozowania poszczególnych roztworów, uzyskano nie tylko przeplot dwóch frakcji włókien, lecz również ich gradientowy rozkład wewnątrz objętości włókniny, analogiczny do włókien PDLGA/PCU opisanych w Rozdziale 13.1. Makroskopowo, stosunek wagowy kopoliestru do poliuretanu w całej włókninie wynosił 60:10 ($\pm 2\%$). W *Eksperymencie 3* otrzymano i zbadano 8 włókien, których matrycę stanowiła mieszanina PCLTMC:PCL. Składy poszczególnych materiałów przedstawiono w Tabeli 20.

Tabela 20. Składy włókien PCLTMC:PCL/PCU otrzymanych w *Eksperymencie 3*

Lp.	Oznaczenie	Polimer biodegradowalny	Rozpuszczalnik	Modyfikator	[%] SLM = [%] DiNa (w stosunku do PDLGA)
1	PCLTMC:PCL/0/D	PCLTMC:PCL	DCM	Brak	0
2	PCLTMC:PCL/5/D	PCLTMC:PCL	DCM	Brak	5
3	PCLTMC:PCL/Sil/0/D	PCLTMC:PCL	DCM	ChronoSil	0
4	PCLTMC:PCL/Sil/5/D	PCLTMC:PCL	DCM	ChronoSil	5
5	PCLTMC:PCL/Thane/0/D	PCLTMC:PCL	DCM	HydroThane	0
6	PCLTMC:PCL/Thane/5/D	PCLTMC:PCL	DCM	HydroThane	5
7	PCLTMC:PCL/Flex/0/D	PCLTMC:PCL	DCM	ChronoFlex	0
8	PCLTMC:PCL/Flex/5/D	PCLTMC:PCL	DCM	ChronoFlex	5

14. Wpływ inkubacji w wodnym roztworze PBS na właściwości PCU

Wprowadzenie poli(węglano uretanowych) nanowłókien, różniących się hydrofilowością oraz właściwościami mechanicznymi, było podstawowym założeniem niniejszej pracy, mającym na celu wpływ na powinowactwo włókien do wody i szybkość procesów dyfuzyjnych, związanych z degradacją hydrolityczną oraz uwalnianiem leków. Przed rozpoczęciem właściwej części badań, z puli dostępnych handlowo PCU finalnie wybrano trzy rodzaje, różniące się hydrofilowością, temperaturą zeszklenia i właściwościami mechanicznymi. Aby sprawdzić ich stabilność w trakcie degradacji hydrolitycznej przeprowadzono inkubację w wodnym roztworze PBS w temperaturze 37 °C przez 84 dni. W tym czasie, na podstawie położenia sygnałów na widmach uzyskanych metodą spektroskopii NMR, nie zaobserwowano zmian w strukturze chemicznej. Również wyznaczone wartości średnich mas molowych nie uległy zmianom. Stwierdzono więc, że wybrane poliuretany wykazywały stabilność w warunkach degradacji hydrolitycznej w czasie 84 dni. Zatem, założono, że wpływ nanowłókien PCU na procesy dyfuzyjne w obrębie docelowych włókien otrzymanych metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia powinien być stały i niezmienny w czasie inkubacji. Wprowadzenie do badanego układu frakcji polimeru nieulegającego degradacji hydrolitycznej miało również na celu stabilizację oraz poprawę jego właściwości mechanicznych. Z tego względu, przeprowadzono statyczną próbę rozciągania elektroprzędzonych włókien PCU otrzymanych z roztworów w DMAc. Badaniu poddano próbki o wyjściowych wymiarach 10x60 mm i grubości 422±76 µm. Zaobserwowano pewne zmiany właściwości mechanicznych, mające miejsce w czasie inkubacji (Tabela 21). Przykładowe krzywe rozciągania przedstawiono na Rys. 29. Pomiar wyjściowy (przed inkubacją) wykonano na mokrych materiałach, po godzinnej immersji w wodnym roztworze PBS w temperaturze 37 °C.



Rys. 29. Zmiany przebiegu przykładowych krzywych zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ), zmierzone w statycznej próbie rozciągania poliuretanowych włókien inkubowanych przez 84 dni w 37 °C

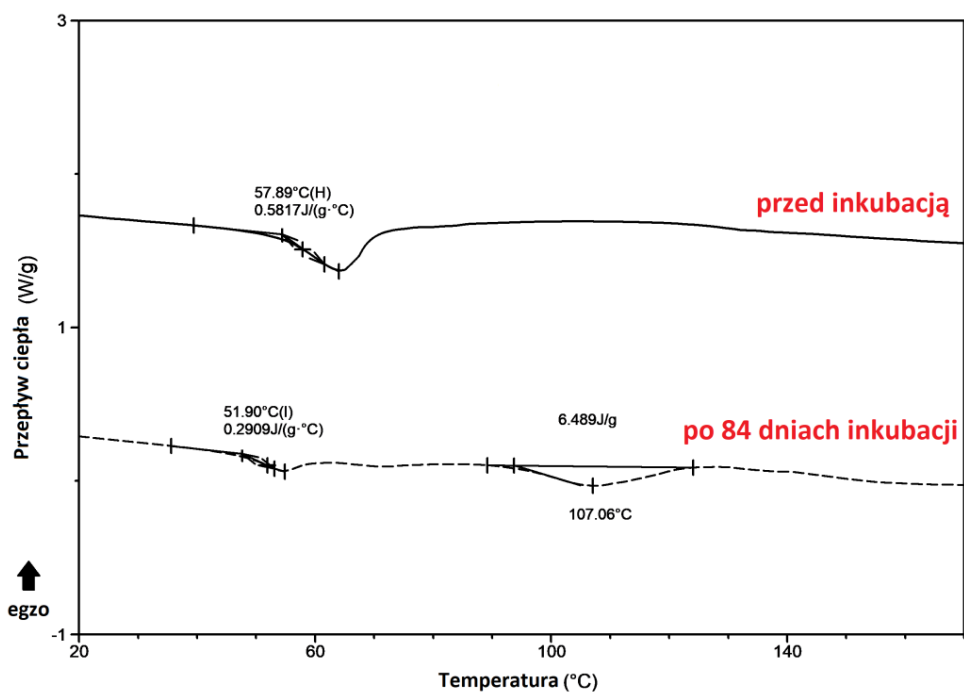
Tabela 21. Zmiany właściwości mechanicznych włókien PCU w czasie 84 dni inkubacji w roztworze PBS w 37 °C ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Etap degradacji	Parametr	Poliuretan		
		ChronoSil	HydroThane	ChronoFlex
Dzień 0	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	0,30±0,05	1,29±0,06	2,10±0,35
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	0,51±0,07	1,69±0,18	Zerwanie
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	0,86±0,11	2,08±0,12	Zerwanie
	σ_{max} [MPa] ($\epsilon_{\sigma_{max}}$ [%])	5,05±0,94 (400,38±54,62)	6,53±0,07 (455,25±0,71)	2,26±0,31 (35,25±1,03)
	σ_y [MPa] (ϵ_y [%])	Nie zaobserwowano Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano Nie zaobserwowano	1,95±0,30 (7,04±1,31)
Dzień 28	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	0,37±0,06	1,25±0,03	8,11±0,24
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	0,64±0,06	1,69±0,07	9,16±0,29
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	1,10±0,10	2,17±0,05	Zerwanie
	σ_{max} [MPa] ($\epsilon_{\sigma_{max}}$ [%])	5,21±0,54 (373,08±14,89)	6,23±0,39 (467,50±2,00)	9,35±2,55 (66,26±17,31)
	σ_y [MPa] (ϵ_y [%])	Nie zaobserwowano Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano Nie zaobserwowano	6,05±0,58 (5,53±0,51)
Dzień 84	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	0,40±0,04	1,30±0,04	8,22±0,17
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	0,70±0,05	1,76±0,03	9,22±0,16
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	1,29±0,09	2,27±0,04	Zerwanie
	σ_{max} [MPa] ($\epsilon_{\sigma_{max}}$ [%])	5,89±0,18 (358,18±14,84)	6,98±0,21 (440,88±7,99)	9,45±0,54 (68,77±24,35)
	σ_y [MPa] (ϵ_y [%])	Nie zaobserwowano Nie zaobserwowano	Nie zaobserwowano Nie zaobserwowano	6,62±0,78 (11,58±0,04)

$\sigma(\epsilon 25\%)/(\epsilon 50\%)/(\epsilon 100\%)$ – naprężenie przy odkształceniu 25%/50%/100%; σ_{max} - wytrzymałość na rozciąganie; $\epsilon_{\sigma_{max}}$ – odkształcenie odpowiadające maksymalnej wartości naprężenia; σ_y – naprężenie na granicy sprężystości; ϵ_y odkształcenie na granicy sprężystości;

W czasie 84 dni inkubacji, zaobserwowano jedynie niewielkie zmiany właściwości mechanicznych włókien HydroThane. Materiał ten wykazywał tendencję do orientacji w kierunku rozciągania, dlatego wytrzymałość na rozciąganie (najwyższa wartość naprężenia), występowała przy bardzo dużych odkształceniach. W przypadku włókien ChronoSil zmiany były zauważalne, jednak dla odkształceń poniżej 100% można je uznać za pomijalnie małe. Również w tym przypadku materiał miał tendencję do orientacji. Oba elastomery cechowała dobra stabilność właściwości mechanicznych i zdolność do dużych odkształceń. Wszelkie zmiany wynikały jedynie z niewielkiego skurczu włókien, powodującego pewien wzrost jej gęstości objętościowej. ChronoFlex wykazywał znacznie większą wytrzymałość już przy niewielkich odkształceniach. Wynikało to wartości temperatury zeszklenia T_g , która była wyższa, niż temperatura pomiaru. Co ciekawe, właściwości mechaniczne tego polimeru w czasie inkubacji uległy znacznej poprawie. Krzywe zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ) po 28 i 84 dniach miały niemal taki sam przebieg, co świadczyło o tym, że zmiana w materiale zaszła tylko raz, w czasie do 28 dnia, i nie ulegała postępowi na późniejszym etapie eksperymentu.

Obserwacja ta była najprawdopodobniej wynikiem zarówno niewielkiego skurczu włókniny, co spowodowało wzrost jej gęstości objętościowej, jak również pojawienia się pewnej zawartości fazy krystalicznej w materiale na skutek krystalizacji na zimno, co potwierdził pomiar DSC (Rys. 30).



Rys. 30. Topnienie fazy krystalicznej we włókninie ChronoFlex (pierwszy bieg pomiaru DSC, 20 °C/min)

15. Badanie włókien PDLGA/PCU

W niniejszej części pracy wyznaczono profile równoczesnego uwalniania sirolimusu i soli sodowej diklofenaku z mikrowłókien PDLGA, zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien poli(węglano uretanowych) (PCU) o różnej hydrofilowości. Zbadano również szybkość degradacji hydrolitycznej kopoliestrowej matrycy oraz przeprowadzono pomiary właściwości mechanicznych otrzymanych materiałów w trakcie tego procesu. Wykonano także test polegający na badaniu przenikania modelowego barwnika (błękitu bromofenolowego) przez wewnętrzną warstwę włókniny w postaci wytworzonej metodą elektrorozpylenia membrany. Przeprowadzono również badanie cytotoksyczności otrzymanych materiałów oraz adhezji fibroblastów na ich powierzchni. Wykorzystując PDLGA, jako nośnik leków przeprowadzono dwa eksperymenty różniące się sposobem elektroprzędzenia frakcji biodegradowalnej:

- *Eksperyment 1* – stosując roztwory w HFIP wytworzono nieporowate mikrowłókna PDLGA, które zostały zmodyfikowane nanowłóknami hydrofobowego i niehigroskopijnego PCU ChronoSil oraz higroskopijnego, bardziej hydrofilowego HydroThane. Badano włókniny o początkowym stężeniu SLM i DiNa w kopoliestrowej matrycy wynoszącym po 5% oraz po 10% wag. dla każdego z leków.
- *Eksperyment 2* – stosując roztwory w DCM wytworzono porowate mikrowłókna PDLGA, które zostały zmodyfikowane nanowłóknami hydrofobowego i niehigroskopijnego PCU ChronoSil, higroskopijnego, bardziej hydrofilowego HydroThane oraz najbardziej hydrofilowego, ChronoFlex. Początkowa ilość zarówno SLM jak i DiNa, wprowadzonych do kopoliestrowej matrycy wynosiła po 5% wag. *Eksperyment 2* miał na celu ewaluację dwóch sposobów przyspieszenia uwalniania leków w stosunku do *Eksperymentu 1*.

15.1. *Eksperyment 1 - badanie włókien PDLGA otrzymanych z roztworów w HFIP, zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien ChronoSil oraz HydroThane*

Metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia wytworzono częściowo biodegradowalne włókniny, składające się z mikrowłókien PDLGA otrzymanych z roztworów w HFIP oraz oplatających je poli(węglano uretanowych) modyfikatorów w formie nanowłókien ChronoSil oraz HydroThane. Do kopoliestrowej matrycy wprowadzono po 5% i po 10% wag. leków, przy czym stężenie sirolimusu (SLM) zawsze odpowiadało stężeniu soli sodowej diklofenaku (DiNa). W *Eksperyment 1* oprócz uwalniania substancji aktywnych, zbadano również wpływ modyfikatorów w postaci nanowłókien PCU na szybkość degradacji hydrolitycznej PDLGA i właściwości mechaniczne oraz przeprowadzono badania biologiczne z wykorzystaniem linii komórkowej fibroblastów.

15.1.1. *Analiza zmian morfologii powierzchni włókien*

Metodą skaningowej mikroskopii elektronowej SEM analizowano zmiany w morfologii powierzchni otrzymanych włókien, zachodzące podczas procesu degradacji hydrolitycznej w czasie 168 dni inkubacji. Metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia uzyskano sieć kopoliestrowych mikrowłókien

przeplatających się z nanowłóknami PCU. Strukturę powierzchni wytworzonych materiałów przedstawiono na Rys. 31.

Zmiany rozmiarów włókien badano tylko w przypadku frakcji PDLGA, ponieważ nanowłókna PCU nie ulegały erozji oraz nie pęczniały w czasie prowadzenia obserwacji. Średnia wartość średnic nanowłókien ChronoSil wynosiła 649 ± 87 nm, a HydroThane 324 ± 93 nm w całym okresie inkubacji. Niemal dwukrotnie większe wymiary włókien uzyskane w przypadku ChronoSilu, pomimo elektroprzędzenia roztworów o podobnej lepkości, przy takich samych parametrach procesu, wynikała z dwóch czynników. Pierwszym z nich była niewielka różnica w szybkości dozowania, wynikająca z zastosowania roztworów o nieco innym stężeniu, przy konieczności uzyskania takiego samego stosunku poliestru do poliuretanu we włókninach (Tabela 15). HydroThane wykazywał nieco niższą średnią masę molową, dlatego zastosowano wyższe stężenie roztworu. Drugim, czynnikiem mającym prawdopodobnie większy wpływ na uzyskane wartości średnic nanowłókien była różna liczba nośników ładunku elektrycznego w poszczególnych roztworach PCU i inna siła oddziaływań międzycząsteczkowych [254, 255]. Wprowadzenie frakcji PCU miało pewien niewielki wpływ na początkowe wartości średnic mikrowłókien PDLGA, co wynikało z wzajemnego oddziaływania pól elektrycznych jednoimiennie naładowanych strumieni roztworów, elektroprzędzonych w tym samym czasie.

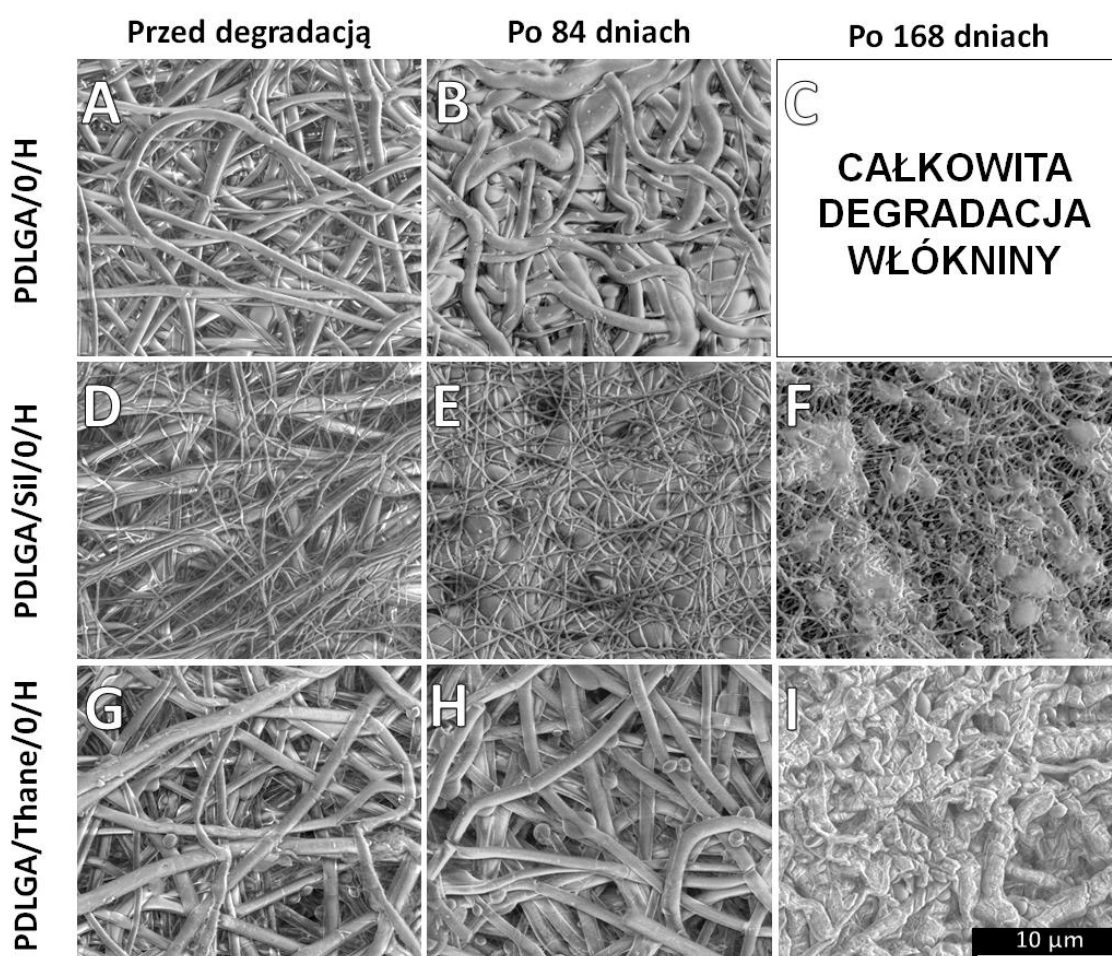
Istotne zmiany w morfologii powierzchni włóknin zaobserwowano podczas degradacji hydrolitycznej (Rys. 31). Uzyskane średnie wartości średnic mikrowłókien PDLGA niezawierających leków przedstawiono w Tabeli 22. Zaobserwowano, że kopoliestrowe mikrowłókna w niezmodyfikowanej nanowłóknami PCU oraz lekami włóknine odniesienia, w czasie inkubacji wykazywały tendencję do pęcznienia i zmniejszania się objętości przestrzeni pomiędzy nimi. Nastąpił także skurcz, wynikający z indukowanej temperaturowo relaksacji naprężeń, powstałej w fazie amorficznej podczas elektroprzędzenia. Po 84 dniach wartość średnic kopoliestru wzrosła o $24 \pm 3\%$ (Rys. 31B), natomiast po 168 dniach, na skutek degradacji i erozji nastąpił całkowity rozkład włókniny. Niskocząsteczkowa frakcja produktów ubocznych hydrolizy w całości została przetransportowana do medium degradacyjnego i rozpuszczona, dlatego nie było możliwości obserwacji powierzchni próbek po zakończeniu eksperymentu. We włókninie do której wprowadzono frakcję hydrofobowych nanowłókien ChronoSil zmierzono, że po 84 dniach inkubacji nastąpił $51 \pm 4\%$ wzrost wielkości średnic mikrowłókien PDLGA (Rys. 31E). Wystąpił także niemal całkowity zanik wolnych przestrzeni pomiędzy poszczególnymi włóknami oraz silne uszczelnienie powierzchni zewnętrznej. Mogło to utrudnić transport wody do wnętrza struktury materiału. Po 168 dniach zaobserwowano, że włókna PDLGA połączyły się ze sobą tworząc jednorodną masę, zawieszoną w sieci nanowłókien ChronoSil (Rys. 31F). Na skutek erozji PDLGA, na powierzchni włókniny pojawiły się liczne otwory.

Odmienne wpływy na zmiany w morfologii kopoliestrowej włókniny miało wprowadzenie modyfikatora w postaci bardziej hydrofilowych i higroskopijnych nanowłókien HydroThane. Tym razem, w czasie 84 dni spęcznienie mikrowłókien PDLGA było nieznaczne, wynosiło bowiem mniej niż 2%. Ponadto, polimer nie wykazywał śladów erozji, nie wystąpiło również uszczelnienie powierzchni zewnętrznej (Rys. 31H). Nawet po 168 dniach można było rozróżnić poszczególne włókna PDLGA.

Niejmniej jednak, na tym etapie doszło zapadnięcia się struktury oraz wzrostu średniej wartości średnic o $24\pm 2\%$ (Rys. 31).

Tabela 22. Średnice mikrowłókien PDLGA bez leków, zmierzone podczas inkubacji ($\bar{x}\pm SD$; N=50)

Skład włókniny	Dzień 0	Dzień 84	Dzień 168
	Φ_0 [μm]	Φ_{84} [μm]	Φ_{168} [μm]
PDLGA/0/H	$2,18\pm 0,60$	$2,71\pm 0,72$	Całkowita degradacja
PDLGA/Sii/0/H	$2,64\pm 0,66$	$3,99\pm 1,39$	Brak włóknistej struktury
PDLGA/Thane/0/H	$2,25\pm 0,41$	$2,29\pm 0,44$	$2,80\pm 0,61$



Rys. 31. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU bez leków

Wprowadzenie leków do roztworów PDLGA na etapie elektroprzędzenia, pomimo braku istotnych zmian lepkości, spowodowało spadek wartości średnic mikrowłókien (Tabela 23). Ze względu na jonową budowę, efekt był silniejszy w przypadku zastosowania soli sodowej diklofenaku niż sirolimusu. Obecność ładunku w cząsteczce spowodowała wzrost przewodnictwa roztworu, co poskutkowało zwiększeniem siły oddziaływań z polem elektrycznym. Spowodowało to silniejsze rozciąganie elektroprzędzonej strugi roztworu. Skutkiem wprowadzenia 5% DiNa do matrycy było zmniejszenie rozmiarów włókien PDLGA o $63\pm 3\%$. W przypadku sirolimusu efekt był analogiczny,

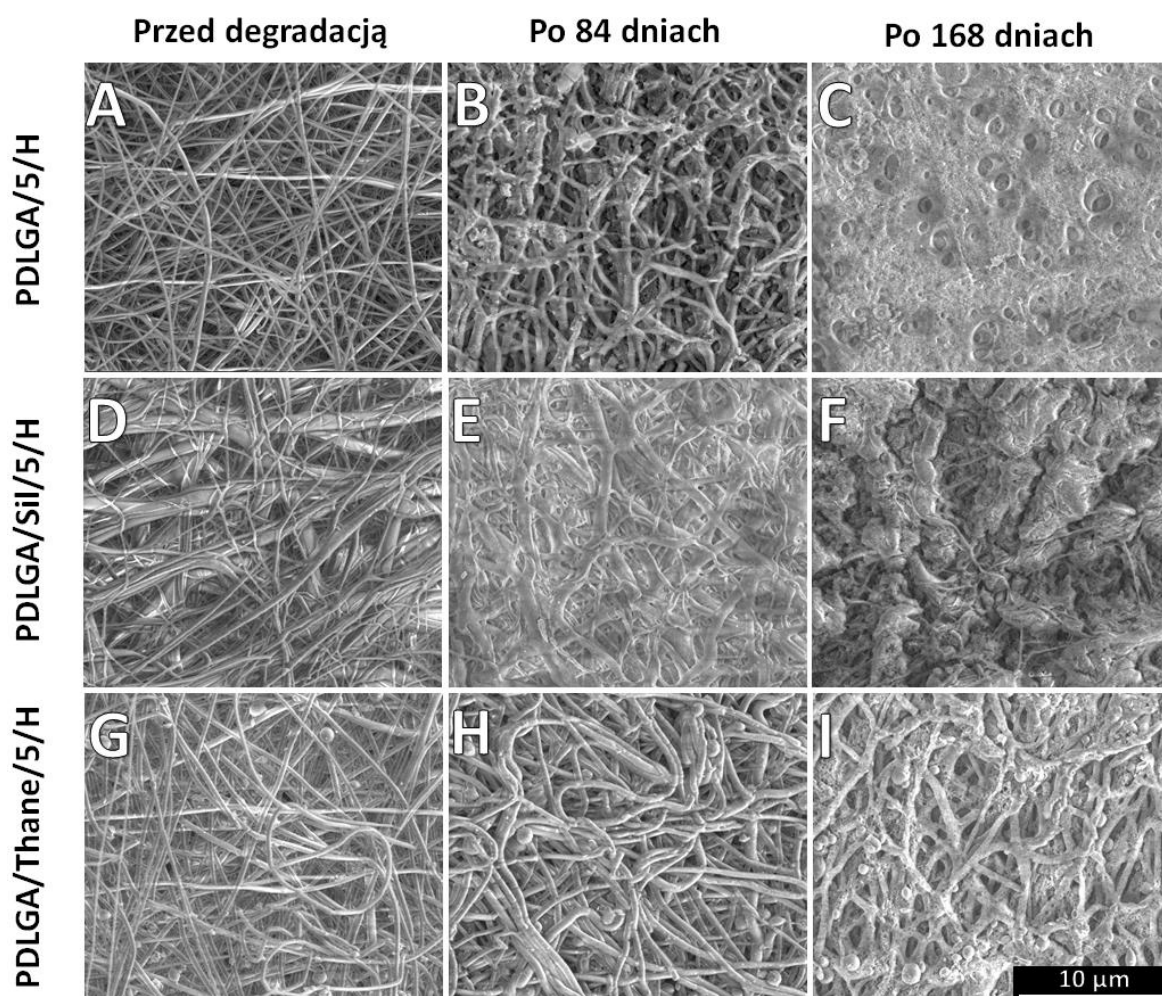
jednak słabszy, ponieważ spadek ich wielkości wynosił $23\pm 3\%$. Mogło to wynikać z mniejszego przewodnictwa roztworu PDLGA zawierającego SLM. Jest to znany efekt, mający miejsce podczas elektroprzędzenia roztworów o różnym przewodnictwie elektrycznym, wynikającym z dodatku substancji małowczątkowej, opisany m.in. w pracy Topuza *et al.* [256]. We włókninach zawierających nanowłókna PCU, wprowadzenie leków dało ten sam efekt, pomimo bardziej skomplikowanego układu pól elektrycznych podczas elektroprzędzenia dwustrumieniowego (Tabela 23).

Zaobserwowano, że rozpuszczalność leków w wodzie w dużym stopniu wpłynęła na morfologię włóknin podczas degradacji hydrolitycznej. Na Rys. 32 przedstawiono zmiany, jakie zaszły w mikrowłóknach PDLGA zawierających 5% wag. DiNa, zaś Rys. 33 pokazuje przebieg eksperymentu dla powierzchni włóknin zawierających 5% wag. rapamycyny. Zaobserwowano, że obecność leków, wpłynęła na proces pęcznienia mikrowłókien nośnika. Dodatkowo, rozpuszczalność danej substancji aktywnej w wodzie determinowała powstawanie porów oraz intensywność procesu erozji.

Sól sodowa diklofenaku wykazuje dobrą rozpuszczalność w wodzie, wynoszącą 21,44 mg/ml [257]. Dzięki temu, lek mógł zostać relatywnie szybko rozpuszczony i usunięty z powierzchni matrycy, co spowodowało powstanie nanoporów. Ich pojawienie się oraz powiększanie, w znacznym stopniu rozwinęło powierzchnię właściwą włókien PDLGA i przyspieszyło procesy erozyjne, co w czasie 84 dni zaobserwowano w materiale PDLGA/5/H oraz PDLGA/Sil/5/H (Rys. 32B i E). Zwiększonej porowatości towarzyszyło spęcznienie włókien, wynoszące $56\pm 5\%$ dla włókniny referencyjnej oraz $108\pm 7\%$ dla zmodyfikowanej nanowłóknami ChronoSil. W tym przypadku stwierdzono, że większa powierzchnia kontaktu z medium ułatwiła wnikanie wody do włókien. Postęp degradacji spowodował jednak, że po 168 dniach nie zachowała się włóknista struktura tych próbek, a frakcja PDLGA zawierająca DiNa w dużej mierze uległa rozkładowi (Rys. 32C i F). W przypadku włókniny zawierającej HydroThane sytuacja wyglądała odmiennie. Spęcznienie po 84 dniach było znaczenie mniejsze ($28\pm 2\%$), nie zaobserwowano również erozji powierzchni (Rys. 32H), jednak po 168 dniach obrazy SEM włókien PDLGA świadczyły o zajściu obu zjawisk. Rozmiary średnic wzrosły tu o $118\pm 6\%$ oraz uzyskano znaczną porowatość powierzchni. Niemniej jednak, w przeciwieństwie do poprzednio omówionych materiałów zawierających DiNa, struktura włóknista przetrwała do końca eksperymentu (Rys. 32I). Takí przebieg zmian morfologii powierzchni świadczył o wolniejszej degradacji mikrowłókien PDLGA, która w dużym stopniu zachodziła na powierzchni (erozja powierzchniowa), w szczególności przez pierwsze 84 dni inkubacji.

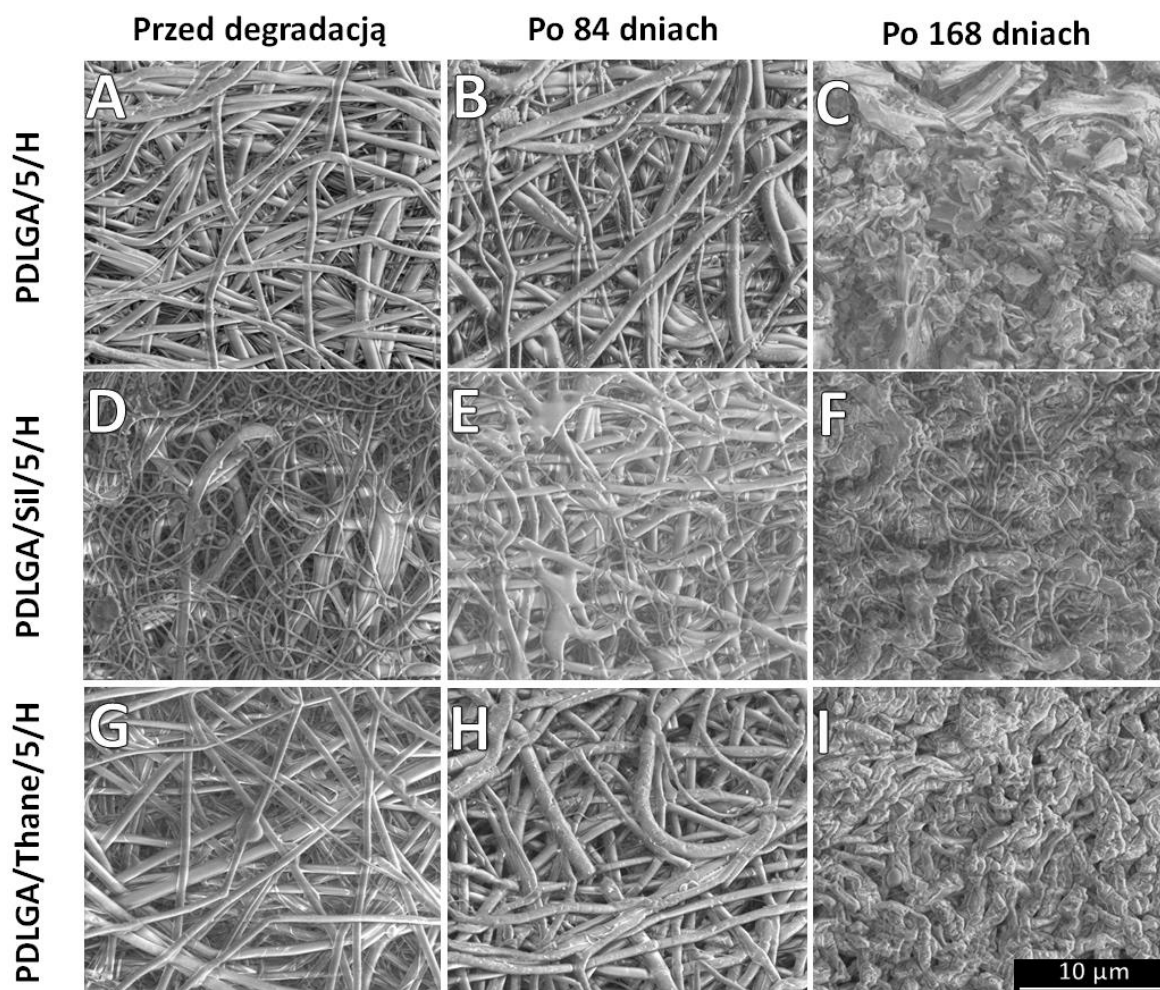
Tabela 23. Średnice mikrowłókien PDLGA (5% SLM i DiNa), zmierzone podczas inkubacji ($\bar{x}\pm SD$; N=50)

Skład włókniny	Dzień 0 ϕ_0 [μm]	Dzień 84 ϕ [μm]	Dzień 168 ϕ [μm]
PDLGA/5/H (SLM)	$1,68\pm 0,47$	$2,40\pm 1,02$	Brak włóknistej struktury
PDLGA/5/H (DiNa)	$0,80\pm 0,28$	$1,25\pm 0,47$	Brak włóknistej struktury
PDLGA/Sil/5/H (SLM)	$1,82\pm 0,36$	$1,88\pm 0,20$	$3,15\pm 0,77$
PDLGA/Sil/5/H (DiNa)	$0,95\pm 0,12$	$1,98\pm 0,55$	Brak włóknistej struktury
PDLGA/Thane/5/H (SLM)	$1,98\pm 0,61$	$1,95\pm 0,56$	$2,14\pm 0,41$
PDLGA/Thane/5/H (DiNa)	$1,06\pm 0,21$	$1,36\pm 0,38$	$2,31\pm 0,87$



Rys. 32. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 5% DiNa

Rozpuszczalność sirolimusu w wodzie wynosi 2,6 $\mu\text{g/ml}$ [258]. Wynika stąd, że jest to lek trudno rozpuszczalny, o charakterze hydrofobowym. W czasie inkubacji zaobserwowano, że jego wprowadzenie do matrycy PDLGA mogło w dużym stopniu wpłynąć na spowolnienie procesu degradacji hydrolytycznej, ponieważ zmiany w morfologii powierzchni były zauważalnie mniejsze. Po 84 dniach, spęcznienie włókien wynoszące $43\pm 4\%$ wystąpiło tylko w materiale niezawierającym nanowłókien PCU (Rys. 33B). W pozostałych przypadkach, niezależnie od typu zastosowanego PCU zmiany rozmiarów średnic mikrowłókien nośnika leku były bardzo małe. Nie stwierdzono również zajścia procesów erozyjnych (powstawania wżerów) na powierzchni PDLGA (Rys. 33E i H). Po 168 dniach niezmodyfikowany materiał odniesienia utracił włóknistą strukturę. Zaobserwowano za to wiele pęknięć na jego powierzchni oraz ślady erozji (Rys. 33C). W tym samym czasie, w obu materiałach zawierających modyfikatory PCU można było w dalszym ciągu rozróżnić poszczególne mikrowłókna, pomimo ich spęcznienia (Rys. 33F i I). W przypadku włókniny PDLGA/Sil/5/H wynosiło $73\pm 5\%$, zaś dla PDLGA/Thane/5/H $10\pm 1\%$. Nie zaobserwowano tu wyraźnych śladów erozji w postaci wżerów, jednak nastąpiło zapadnięcie się struktury i uszczelnienie powierzchni zewnętrznej, szczególnie silne w próbkach zawierających ChronoSil.



Rys. 33. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 5% SLM

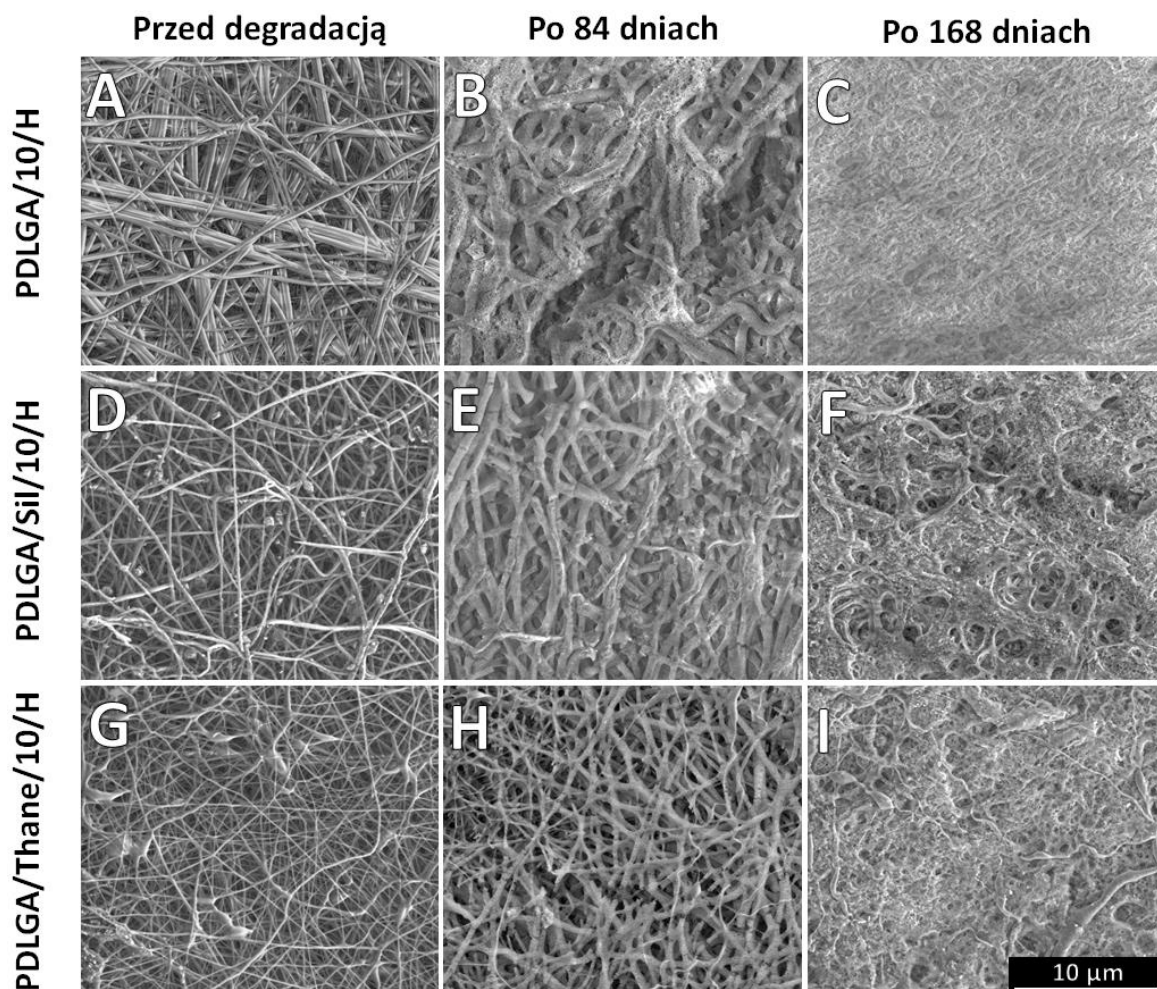
Wzrost zawartości DiNa we włóknach PDLGA z 5% do 10% nie spowodował dalszego zmniejszenia średnic. Mogło to świadczyć o osiągnięciu maksymalnej gęstości ładunku elektrostatycznego na powierzchni elektroprzędzonego roztworu. Dlatego, w tym przypadku dla stałej szybkości dozowania, natężenia pola elektrycznego i warunków otoczenia, została osiągnięta wartość graniczna średnic włókien PDLGA (Tabela 24). Zwiększenie ilości początkowej SLM do 10% spowodowało dalsze zmniejszanie się średnic włókien nośnika leku. Miało to jednak miejsce tylko w przypadku włókniny niezmodyfikowanej nanowłóknami PCU oraz zawierającej ChronoSil (odpowiednio o $29\pm 2\%$ i $23\pm 2\%$). Można więc wnioskować, że w zakresie do 10% wag. stężenia rapamycyny w matrycy, maksymalna gęstość ładunku na powierzchni strumienia elektroprzędzonego roztworu nie została osiągnięta. Wyjątkiem był materiał zawierający kombinację włókien PDLGA i HydroThane. W tym przypadku ilość SLM spowodowała niewielki wzrost średniej wartości średnic włókien kopoliestrowych, o $15\pm 1\%$. Potencjalną przyczyną mogły być wzajemne oddziaływania między polami elektrycznymi generowanymi przez równomiernie naładowane strumienie roztworów PCU i PDLGA podczas dwustrumieniowego elektroprzędzenia [259, 260]. Prawdopodobnie gęstość powierzchniowa ładunków elektrycznych w roztworze HydroThane była wyższa niż w przypadku ChronoSil. Dlatego też, jak już wspomniano na początku tego rozdziału, przy analogicznych

lepkościach roztworów, średnice nanowłókien PCU różniły się rozmiarami. Można więc podejrzewać, że w przypadku włókien modyfikowanych nanowłóknami HydroThane, oddziaływania pomiędzy polami elektrycznymi jednocześnie elektroprzędzonych strumieni roztworów mogą na siebie wpływać tym mocniej, im większa gęstość powierzchniowa jednoimiennych ładunków na powierzchni każdego z nich. W rezultacie przy tej samej wartości różnicy potencjałów elektrycznych pomiędzy dyszą przędzalniczą a kolektorem włókien, siły działające na strumień zawierający rozpuszczony SLM, mogły być słabsze, niż w przypadku pozostałych materiałów. Jednocześnie, osiągnięcie maksymalnej gęstości ładunków na powierzchni roztworu, w którym rozpuszczono DiNa spowodowało, że interakcja ze strumieniem równocześnie elektroprzędzonego roztworu PCU była taka sama zarówno w przypadku wprowadzenia 5% jak i 10% leku do mikrowłókien PDLGA, stąd brak zmian w zmierzonych wartościach średnic. Niemniej jednak próby pełnego wyjaśnienia tego zjawiska wymagają przeprowadzenia odrębnych badań.

Tabela 24. Średnice mikrowłókien PDLGA (10% SLM i DiNa), zmierzone podczas inkubacji ($\bar{x} \pm SD$; N=50)

Skład włókniny	Dzień 0	Dzień 84	Dzień 168
	Φ_0 [μm]	Φ [μm]	Φ [μm]
PDLGA/10/H (SLM)	1,20 \pm 0,56	1,79 \pm 0,90	1,41 \pm 0,67
PDLGA/10/H (DiNa)	0,79 \pm 0,35	1,46 \pm 0,50	Brak włóknistej struktury
PDLGA/Sil/10/H (SLM)	1,41 \pm 0,37	1,82 \pm 0,09	3,71 \pm 0,50
PDLGA/Sil/10/H (DiNa)	1,07 \pm 0,22	1,52 \pm 0,23	Brak włóknistej struktury
PDLGA/Thane/10/H (SLM)	2,28 \pm 0,48	2,22 \pm 0,52	1,89 \pm 0,63
PDLGA/Thane/10/H (DiNa)	1,09 \pm 0,38	1,39 \pm 0,22	Brak włóknistej struktury

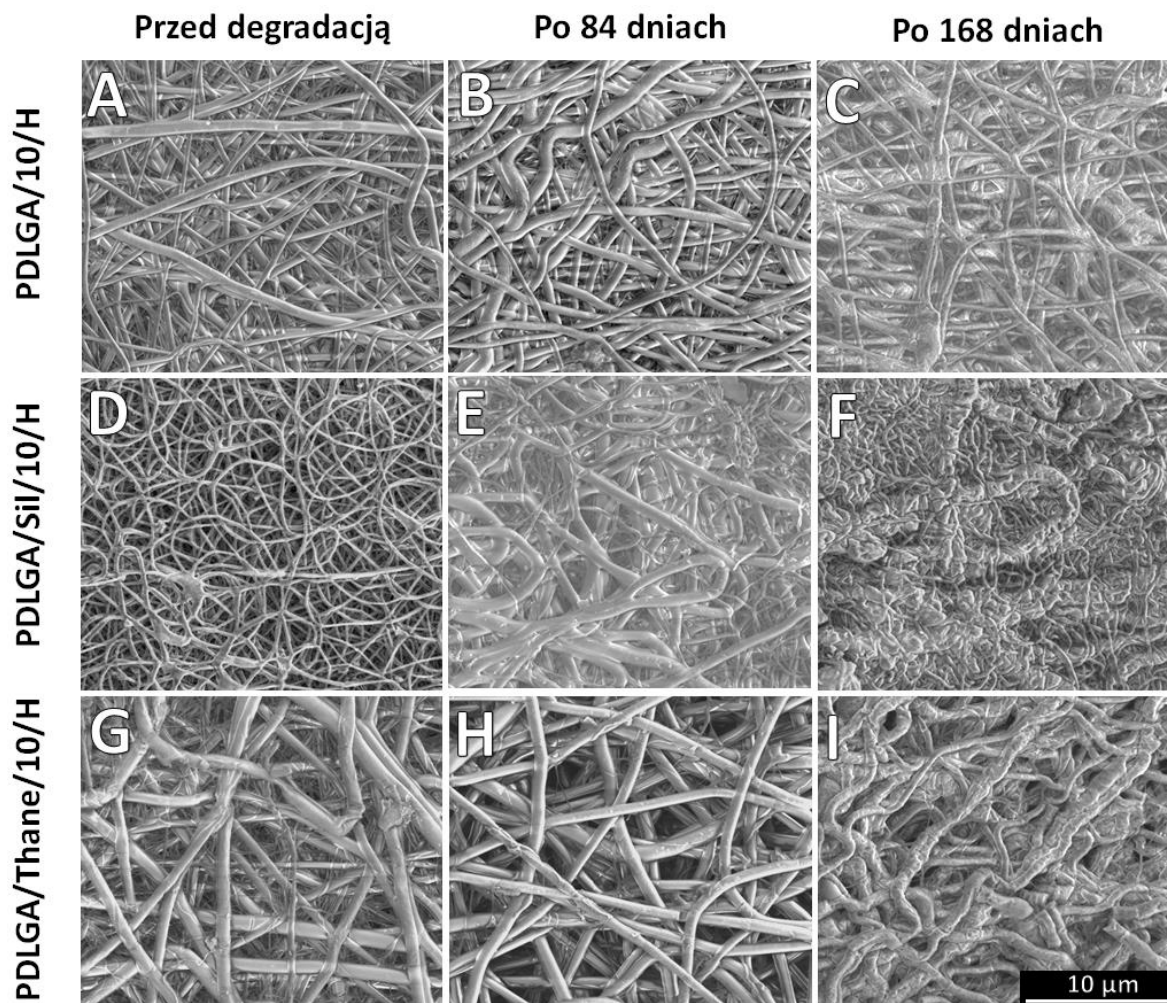
Mikrowłókna PDLGA, do których wprowadzono 10% DiNa, w ciągu 84 dni degradacji hydrolytycznej wykazywały podobne tendencje do zawierających o połowę mniejszą ilość leku. Również nastąpiło pęcznienie, przy czym największy wzrost wartości średnic wynoszący 84 \pm 5% zmierzono dla włókniny niezmodyfikowanej PCU (Tabela 24). W materiale, do którego wprowadzono hydrofobowy ChronoSil, spęcznienie było znacznie mniejsze przy 10% zawartości DiNa, leku niż przy 5% (odpowiednio 42 \pm 3% i 108 \pm 9%). Najmniejsze zmiany wielkości średnic mikrowłókien PDLGA ponownie miały miejsce w próbkach z przeplotem nanowłókien HydroThane. Wzrost ich rozmiarów był niemal taki sam, jak przy materiale zawierającym 5% leku i wynosił 27 \pm 3%. W żadnej z włókien w czasie 84 dni nie nastąpiło całkowite zapadnięcie się struktury, choć objętość wolnych przestrzeni uległa widocznemu zmniejszeniu. Z drugiej strony, erozja powierzchni włókien PDLGA była znacznie silniejsza, ze względu na wytworzenie większej liczby nanoporów, które powiększały swoje rozmiary w trakcie degradacji hydrolytycznej (Rys. 34B, E i H). Dlatego, po 168 dniach inkubacji wszystkie próbki utraciły swoją włóknistą strukturę, formując porowatą powierzchnię przypominającą membranę (Rys. 34C, F i I). W przypadku materiałów zawierających nanowłókna modyfikatora, możliwe było zaobserwowanie wytworzonego z nanowłókien PCU, nieulegającego biodegradacji rusztowania włókniny.



Rys. 34. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 10% DiNa

Zwiększenie stężenia sirolimusu we włóknach PDLGA do 10% miało niemal taki sam wpływ na przebieg degradacji hydrolytycznej oraz spęcznienie w czasie 84 dni, jak w przypadku 5% ilości rapamycyny w matrycy. Zaobserwowano jedynie, że nieco wzrosła średnia wartość średnic włókien kopoliestru w materiałach PDLGA/10/H oraz PDLGA/Sil/10/H w stosunku do ich odpowiedników o mniejszej zawartości SLM. W przypadku włókniny zawierającej nanowłókna HydroThane ponownie nastąpił niewielki spadek rozmiarów włókien nośnika leku (około 3%). Żadna z próbek w czasie 84 dni obserwacji nie wykazywała śladów erozji powierzchni oraz nie utraciła struktury włókniny, co wynikało ze zwiększenia hydrofobowości matrycy na skutek wzrostu stężenia SLM. W przypadku materiałów, gdzie pojawiło się spęcznienie włókien PDLGA, objętość wolnych przestrzeni uległa zmniejszeniu (Rys. 35). Po 168 dniach eksperymentu okazało się, że w przypadku włókien PDLGA/10/H i PDLGA/Thane/10/H średnie wartości średnic mikrowłókien kopoliestru uległy zmniejszeniu, odpowiednio o $21\pm 2\%$ i $15\pm 2\%$. Natomiast w przypadku PDLGA/Sil/10/H, nastąpił znaczny wzrost średnic włókien o $108\pm 11\%$ oraz uszczelnienie struktury materiału, którego nie zaobserwowano w dwóch poprzednich próbkach. Uzyskany wynik sugerował, że w pierwszych dwóch włókninach silniej promowana była erozja powierzchniowa, natomiast w materiale zawierającym nanowłókna

hydrofobowego ChronoSil, decydujący wpływ mogła odgrywać degradacja i erozja w masie, a także w większym stopniu zaburzone zostały procesy związane z transportem wody i oligomerów.



Rys. 35. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 10% SLM

W eksperymencie zaobserwowano, że wprowadzenie przeplotu nanowłókien PCU o różnej hydrofilowości do kopoliestrowej włókniny, miało wpływ na spęcznie mikrowłókien PDLGA oraz zmianę objętości wolnych przestrzeni pomiędzy nimi. Mogło to spowodować różnice w zdolności do absorbowania wody oraz transporcie produktów hydrolizy do otoczenia. Uzyskane rezultaty sugerują, że w zależności od zastosowanego modyfikatora PCU zostały wymuszone różne mechanizmy degradacji i erozji mikrowłókien PDLGA, co potwierdziły wyniki kolejnych analiz. Wprowadzenie leków w znacznym stopniu wpłynęło na zmiany zachodzące w obrębie biodegradowalnej frakcji kopoliestru w czasie inkubacji. Łatwo rozpuszczalna w wodzie sól sodowa diklofenaku sprzyjała pęcznieniu włókien PDLGA oraz powstawaniu porów, przez co, za sprawą rozwinięcia powierzchni właściwej, mogła przyczynić się do przyspieszenia procesu degradacji hydrolytycznej. Z drugiej strony, trudno rozpuszczalny w wodzie sirolimus hydrofobizował włókna matrycy, stabilizując morfologię włókien. Mogło to wpłynąć na spowolnienie degradacji poprzez ograniczenie reakcji hydrolizy. Wprowadzenie

dwa razy większej ilości leków zintensyfikowało obserwowane efekty. Wnioski dotyczące wpływu leków na degradację hydrolityczną PDLGA wysunięte na podstawie analizy obrazów SEM są zbieżne z wynikami dalszych badań.

15.1.2. Pomiary absorpcji wody przez włókniny PDLGA/PCU

Struktura włókniny charakteryzuje się dużym stosunkiem powierzchni do objętości (P:V), co wiąże się z obecnością wolnych przestrzeni pomiędzy włóknami. W warunkach degradacji hydrolitycznej przedostaje się do nich woda, skąd może wnikać bezpośrednio do włókien polimeru. Na ten proces wpływa makroskopowa hydrofilowość włókniny, wynikająca z powinowactwa do wody jej komponentów, rozwinięcia powierzchni materiału (porowatości) oraz jego wewnętrznej struktury. Im większa hydrofilowość i powierzchnia właściwa, tym absorpcja wody przebiega łatwiej. Faza amorficzna, ze względu na mniejszą gęstość od fazy krystalicznej ułatwia transport wody w głąb polimeru, co w przypadku degradacji hydrolitycznej umożliwia zajście hydrolizy wewnątrz materiału. Jednak, ze względu na niskie gęstości objętościowe elektroprzędzonych włókien, objętość wody, która mogła wnikać bezpośrednio do masy polimeru była znacznie mniejsza od jej ilości znajdującej się w przestrzeniach pomiędzy włóknami. Na skutek zjawisk kapilarnych, nawet po wyciągnięciu włókniny z medium inkubacyjnego woda mogła tam pozostawać przez pewien czas.

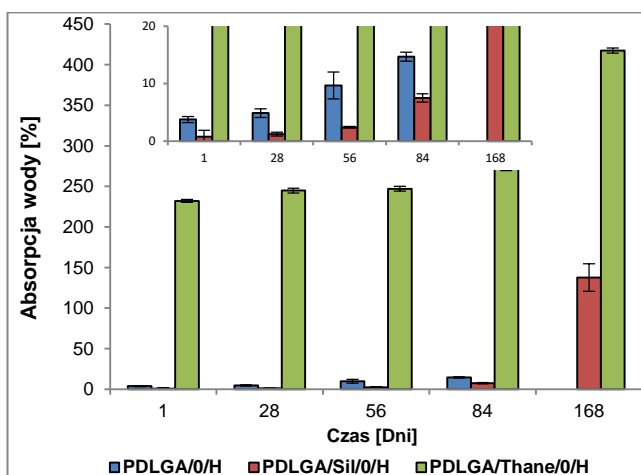
Podczas inkubacji włókien w wodnym roztworze PBS, monitorowano zmiany ich zdolności do absorbowania wody. Pomimo wstępnego osuszania próbek, w celu usunięcia wilgoci zgromadzonej bezpośrednio na powierzchni próbek, na ilość pochłoniętego przez nie medium degradacyjnego wpływ miała suma dwóch czynników: ilości wody w przestrzeniach pomiędzy włóknami oraz ilość wody zabsorbowana bezpośrednio przez włókna. Należy dodać, że oprócz kopoliestru, wodę wchłaniały również nanowłókna PCU: ChronoSil w ilości poniżej 1% wag. oraz HydroThane, który ze względu na swoją higroskopijność absorbował jej około $20 \pm 1\%$ wag.

Materiał odniesienia, niezawierający leków (PDLGA/0/H), wykazywał słabą zdolność do wchłaniania wody (Rys. 36). Po 84 dniach zaabsorbował jej $15 \pm 1\%$ wag. Potencjalną przyczyną mógł być wzrost wartości kąta zwilżania włókniny ($120,6 \pm 2,5^\circ$) w stosunku do wylewanej folii, która była punktem odniesienia ($74,7 \pm 1,2^\circ$), a także szybko pojawiający się w warunkach inkubacji skurcz, obserwowany już po kilku godzinach, który spowodował zmniejszenie objętości przestrzeni pomiędzy włóknami. Wymienione czynniki zmniejszyły zdolność wody do penetrowania wnętrza włókniny. Na jej wnikanie bezpośrednio do polimeru wpływał również brak porowatości włókien PDLGA. Z tego względu dyfuzja wody przez polimer, znajdujący się w temperaturze inkubacji w stanie szklistym, była utrudniona. Przeprowadzenie pomiaru po 168 dniach nie było możliwe, ze względu na całkowity rozkład włókniny.

Zastosowanie przeplotu mikrowłókien PDLGA z nanowłóknami PCU miało znaczny wpływ na zmianę chłonności próbek (Rys. 36). Wprowadzenie ChronoSilu, bardziej hydrofobowego niż kopoliester, spowodowało obniżenie zdolności włókniny do absorpcji wody. Po 84 dniach wyniosła ona $8 \pm 1\%$ wag. Na obrazach SEM zaobserwowano znaczne spęcznienie włókien PDLGA w tym materiale, a także uszczelnienie jego powierzchni (Rys. 31B), co było przyczyną obniżenia jej zdolności do wchłaniania wody. Ponadto, ChronoSil zwiększył hydrofobowość włókniny, przez co transport medium

degradacyjnego do przestrzeni w jej wnętrzu został utrudniony. Z tego powodu, woda nie zdołała wniknąć w dużej ilości w głąb struktury, gdyż na skutek degradacji uległa zapadnięciu. Po 168 dniach, w wyniku erozji i dyfuzji produktów degradacji, na powierzchni materiału powstały otwory, umożliwiające swobodny przepływ wody (Rys. 31F), co spowodowało znaczny wzrost jego chłonności do $138\pm 17\%$.

Przeplot z nanowłóknami higroskopijnego HydroThane, wywołał duże zmiany w zdolności do absorpcji roztworu PBS. Już po 24 godzinach wynosiła $232\pm 2\%$, jednak do 84 dnia przyrost jej wartości był relatywnie niewielki, gdyż zanotowano $273\pm 4\%$. Wykorzystany PCU, pomimo swoich właściwości sprzyjających wchłanianiu wody (maksymalnie 20% wag.) stanowił około 40% wag. włókniny. Można więc obliczyć, że teoretyczna jej ilość, którą mógł pochłonąć stanowiła niewielki ułamek z uzyskanych wartości (maksymalnie około 8% wag.). Po 168 dniach chłonność w tym materiale wyniosła $417\pm 3\%$, co było największą wartością spośród próbek bez leków. Widać wyraźnie, że higroskopijne nanowłókna HydroThane ułatwiły wnikanie wody do wolnych przestrzeni. Wysoka zdolność do absorbowania wody w tym przypadku wynikała również z zachowania struktury włókniny przez długi czas (brak skurczu i pęcznienia włókien powodującego uszczelnienie powierzchni) (Rys. 31H).

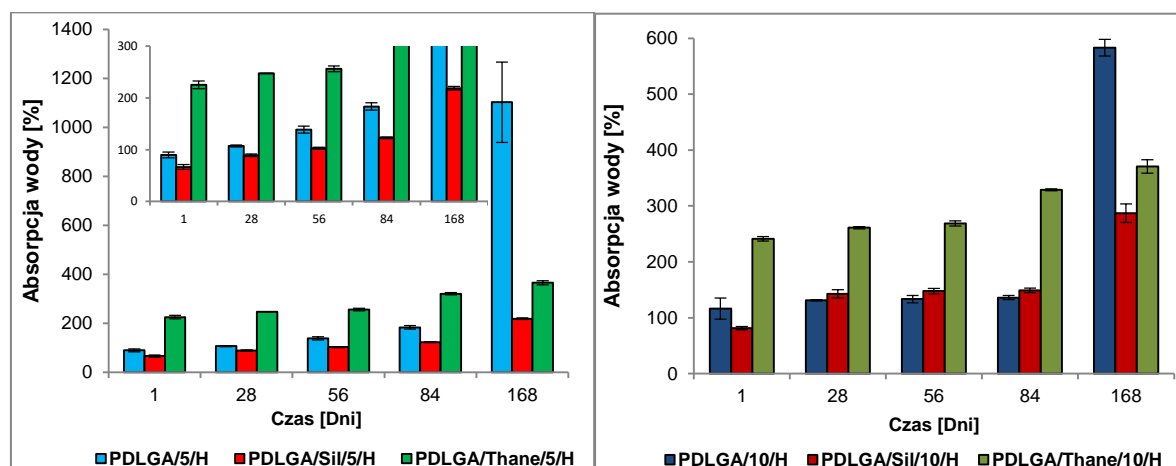


Rys. 36. Ilość wody zaabsorbowanej przez włókniny PDLGA/PCU bez leków ($\bar{x}\pm SD$; N=3)

Duży wpływ na ilość wody pobranej przez włókninę z otoczenia podczas inkubacji, a także przebieg procesów degradacji hydrolitycznej i erozji miało wprowadzenie do matrycy leków o różnej rozpuszczalności. Obie substancje aktywne znajdowały się w danym materiale równocześnie, na jego przeciwległych stronach względem wewnętrznej membrany. Otrzymane wyniki stanowiły zatem wartość wypadkową, zarówno dla części włókniny w której znajdował się DiNa jak i SLM. Na podstawie analizy obrazów SEM można przypuszczać, że łatwo rozpuszczalna sól sodowa diklofenaku, ze względu na generowanie porów i przyspieszanie procesów erozji powierzchni zwiększała zdolność do absorbowania wody, natomiast hydrofobowa rapamycyna przeciwnie – ze względu na hydrofobizację utrudniała jej wnikanie w głąb materiału.

Zaobserwowano, że wprowadzenie substancji aktywnych w znacznym stopniu zwiększyło chłonność włókniny PDLGA zawierającej 5% leków (Rys. 37). Już po 24 godzinach wartość zaabsorbowanej wody wynosiła $90\pm 6\%$, a po 84 dniach $184\pm 7\%$. Na koniec eksperymentu, po 168

dniach, zanotowano w jej przypadku największą ilość wchłoniętej wody spośród wszystkich testowanych na tym etapie badań materiałów, wynoszącą $1103 \pm 164\%$. Podobny wpływ wprowadzenia leków zaobserwowano w przypadku próbek zawierających nanowłókna ChronoSil. Chociaż chłonność ponownie była najniższa, to w porównaniu do swojego odpowiednika niezawierającego substancji aktywnych, znaczny wzrost absorpcji nastąpił już po pierwszej dobie. Ilość pobranego przez włókninę medium degradacyjnego wzrosła w tym przypadku z $1 \pm 1\%$ do $67 \pm 5\%$. Po 84 dniach materiał ten wchłonił $123 \pm 2\%$, a po 168 dniach $219 \pm 3\%$ wody. Wprowadzenie do matrycy po 5% wag. leków tylko w niewielkim stopniu wpłynęło na ilość roztworu PBS zaabsorbowanego przez włókninę PDLGA/Thane/5/H, która w czasie 56 dni była niewiele wyższa od zmierzonej dla jej odpowiednika bez substancji aktywnych. Po 84 dniach wynosiła już jednak $321 \pm 4\%$, co stanowiło wzrost o 48%. Jednak, po 168 dniach chłonność uległa nieznacznemu zmniejszeniu względem materiału PDLGA/Thane/0/H, niezawierającego leków i wyniosła ostatecznie $366 \pm 8\%$. Włóknina, do której wprowadzono nanowłókna HydroThane do 84 dnia inkubacji ponownie wykazywała największą zdolność do wchłaniania wody, jednak po zakończeniu eksperymentu zdecydowanie najwyższą wartość tego parametru wykazywał materiał PDLGA/5/H.



Rys. 37. Ilość wody zaabsorbowanej przez włókniny PDLGA/PCU zawierające po 5% (z lewej) oraz po 10% leków (z prawej) ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Dwukrotne zwiększenie stężenia SLM i DiNa w matrycy PDLGA, w porównaniu do materiałów zawierających po 5% leków, w niewielkim stopniu wpłynęło na wzrost ilości zaabsorbowanej wody (Rys. 37). Wynikało to prawdopodobnie z powstania większej liczby porów, na skutek uwolnienia soli sodowej diklofenaku. Wyjątek stanowił materiał składający się wyłącznie z kopoliestrowych mikrowłókien, ponieważ po 56 dniu włóknina PDLGA/10/H absorbowwała mniejszą ilość wody niż PDLGA/5/H, co było rezultatem znacznego skurczu włókniny oraz większą hydrofobizacją części matrycy PDLGA zawierającej rapamycynę. Porównując między sobą materiały o 10% stężeniu leków w matrycy, stwierdzono, że tendencje były niemal takie same jak w przypadku próbek, do których wprowadzono o połowę mniejszą ilość substancji aktywnych. Ponownie największą ilość wody wchłonił materiał zawierający HydroThane, zaś pozostałe dwie włókniny charakteryzowały się niższą zdolnością do jej absorbowania. Niemniej jednak, w omawianym przypadku to próbki zawierające

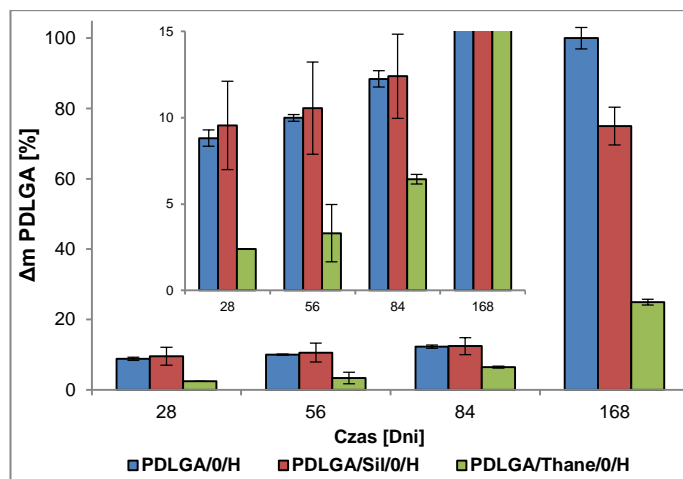
hydrofobowy ChronoSil od 28 dnia inkubacji, wchłaniały nieznacznie większą ilość wody, niż kopoliestrowa włóknina odniesienia, co mogło być spowodowane mniejszym skurczem wynikającym z obecności nanowłókien PCU. Po 168 dniach, pomimo podobnie wyglądających tendencji w stosunku do materiałów zawierających 5% DiNa i SLM, wśród których najwyższą chłonność wykazywała włóknina PDLGA/5/H a najniższą PDLGA/Sil/5/H, to dwukrotne zwiększenie ilości leków dało inny efekt końcowy. Materiał nie zawierający modyfikatora PCU wykazywał prawie dwukrotnie mniejszą zdolność do absorpcji wody ($583 \pm 15\%$), zaś włóknina, do której wprowadzono nanowłókna ChronoSil wchłonęła jej nieco więcej ($287 \pm 16\%$). Zwiększenie stężenia obu leków w matrycy z 5% do 10% niemal nie wpłynęło na chłonność włókniny PDLGA/Thane/10/H, gdyż różnica w tym przypadku wyniosła jedynie 4% wag. ($371 \pm 12\%$).

Jak można zauważyć, omawiany układ wzajemnego oddziaływania polimerów i leków na zdolność do absorbowania medium degradacyjnego przez materiał był skomplikowany i zależał od kilku czynników. Na skutek procesów degradacji, erozji oraz uwalniania leków, w dynamiczny sposób zmieniało się powinowactwo badanych włókien do otaczającego je środowiska. Uzyskane wyniki były konsekwencją makroskopowej hydrofilowości włókien, a także zmian ich struktury wewnętrznej oraz morfologii powierzchni, które zachodziły w czasie inkubacji.

15.1.3. Badanie szybkości erozji na podstawie pomiarów ubytku wagowego frakcji PDLGA

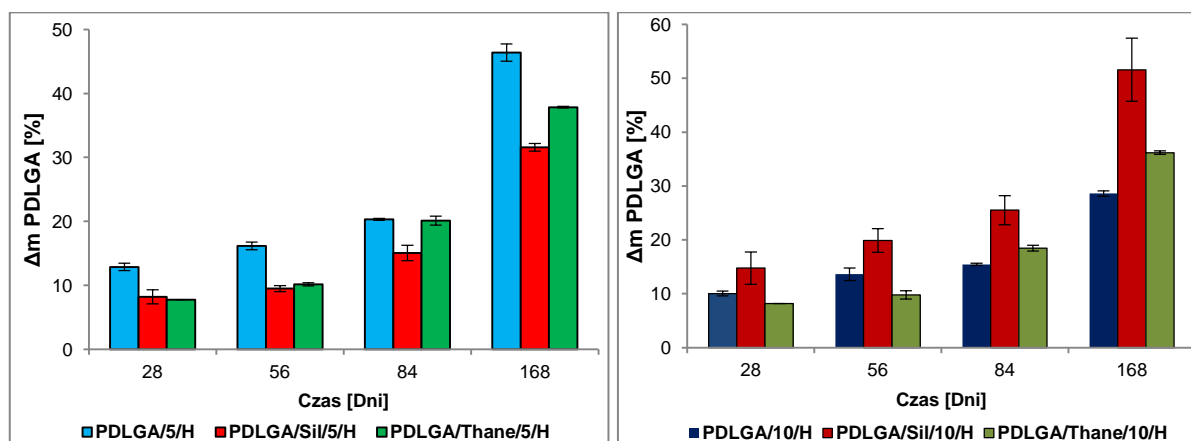
Rezultatem degradacji hydrolitycznej jest powstanie niskocząsteczkowych produktów ubocznych, które na skutek procesów dyfuzyjnych zostają przetransportowane z polimeru do otaczającego środowiska, co skutkuje zmniejszaniem się wagi próbki. Proces ten jest określany mianem erozji. Na Rys. 38 przedstawiono średni ubytek wagowy matrycy (Δm) PDLGA we włókninach niezawierających leków. Można go interpretować, jako procentową (% wag.) część frakcji kopoliestru, która na skutek rozerwania łańcucha osiągnęła na tyle niską masę, by mogła zostać rozpuszczona i przetransportowana do roztworu PBSu.

Erozję frakcji PDLGA zaobserwowano we wszystkich badanych materiałach. Szybkość procesu w przypadku włókniny odniesienia oraz zawierającej nanowłókna ChronoSil była zbliżona. Po 84 dniach, na skutek degradacji początkowa waga mikrowłókien PDLGA zmniejszyła się o odpowiednio $12,2 \pm 3,1\%$ i $12,4 \pm 5,4\%$. Po 168 dniach próbka PDLGA/0/H uległa całkowitemu rozkładowi. W przypadku włókniny PDLGA/Sil/0/H ubytek wagowy Δm PDLGA wynosił $75,0 \pm 3,1\%$. Na obrazach SEM powierzchni materiału, widoczne były jedynie resztki kopoliestru zawieszane w sieci nanowłókien ChronoSil (Rys. 31F). W przypadku włókniny, do której wprowadzono HydroThane, zmiana wagi matrycy była znacznie mniejsza. Po 84 dniach wynosiła $6,4 \pm 0,8\%$, a po 168 dniach $24,9 \pm 1,1\%$. Łącząc powyższe informacje z obserwacjami dokonanymi przy użyciu mikroskopii SEM oraz pomiarami absorpcji wody, można potwierdzić wcześniejszy wniosek, że wprowadzenie do włókniny PDLGA frakcji nanowłókien HydroThane w największym stopniu promowało powierzchniowy proces degradacji, która zachodziła wolniej, ze względu na obecność buforu neutralizującego kwaśne produkty rozkładu łańcuchów na froncie erozji. W przypadku materiału niezmodyfikowanego oraz zawierającego nanowłókna ChronoSil, zaobserwowano większy udział erozji w masie, która zachodziła szybciej ze względu na występowanie efektu autokatalizy reakcji hydrolizy.



Rys. 38. Średni ubytek wagi matrycy PDLGA (Δm PDLGA) podczas erozji włókien bez leków ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Ubytek wagowy PDLGA w materiałach, do których wprowadzono leki wynikał nie tylko z dyfuzji małych cząsteczkowych produktów degradacji do otoczenia, ale również z uwalniania substancji aktywnych. W przypadku włókien, do których wprowadzono po 5% SLM i DiNa, zaobserwowano, że największa wartość Δm wystąpiła w niezmodyfikowanym materiale PDLGA/5/H (Rys. 39). Po 84 dniach wynosiła $20 \pm 1\%$, a po 168 dniach $46 \pm 3\%$. Wprowadzenie nanowłókien PCU spowodowało mniejszy ubytek wagowy. Do 56 dnia w obu przypadkach był on niemal identyczny i wynosił około 10%. Jednak później, procesy degradacji i erozji w materiale PDLGA/Thane/5/H zachodziły szybciej, na skutek czego, po 84 dniach nastąpiło zrównanie się wartości Δm z próbką PDLGA/5/H. Ostatecznie, po 168 dniach średni ubytek wagowy matrycy w materiale zawierającym nanowłókna ChronoSil wynosił $32 \pm 1\%$, a w przypadku włókien, do których wprowadzono HydroThane było to $38 \pm 1\%$.



Rys. 39. Średni ubytek wagi matrycy PDLGA (Δm PDLGA) podczas uwalniania leków i erozji włókien zawierających po 5% (z lewej) i po 10% (z prawej) DiNa i SLM ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Zwiększając zawartość leków w mikrowłóknach nośnika do 10%, zaobserwowano niespodziewany efekt. Erozja PDLGA zachodziła najszybciej w przypadku włókien PDLGA/Sil/10/H, która ze względu na obecność nanowłókien ChronoSil była najbardziej hydrofobowa. W czasie 84 dni

ubytek wagi matrycy wyniósł $26\pm 6\%$, a po 168 dniach $52\pm 4\%$, co było najwyższym wynikiem spośród próbek zawierających leki. Wzrost chłonności wody mógł w tym przypadku wzmocnić efekt autokatalizy, w szczególności we włóknach zawierających pierwotnie DiNa, co doprowadziło do ich zaawansowanego rozkładu, który potwierdzają obserwacje mikroskopowe (Rys. 32F). Do 56 dnia, materiał niezmodyfikowany nanowłóknami PCU wykazywał szybszą erozję niż zawierający HydroThane, jednak do 84 dnia sytuacja uległa odwróceniu. Wartość parametru Δm dla PDLGA/10/H wyniosła $16\pm 1\%$, w czasie gdy dla PDLGA/Thane/10/H było to $19\pm 1\%$. Taka tendencja utrzymała się do zakończenia eksperymentu, gdzie w pierwszym przypadku zawartość frakcji biodegradowalnej zmniejszyła się o $29\pm 2\%$, a w drugim o $36\pm 5\%$.

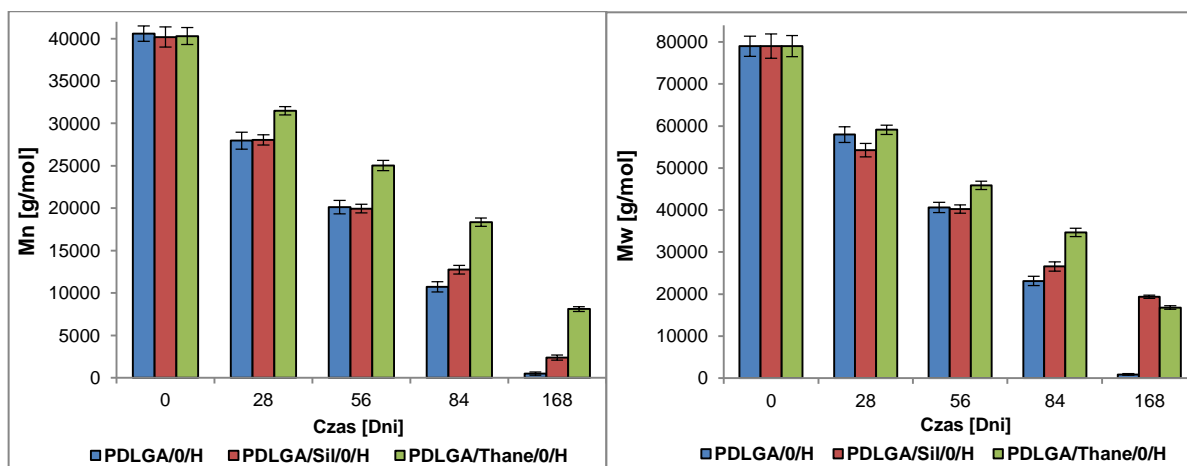
Wpływ leków na szybkość erozji nośnika, podobnie jak w przypadku chłonności wody, był skomplikowany i stanowił wypadkową pomiędzy hydrofilowością polimerowych komponentów i rozpuszczalnością leków. Łatwo rozpuszczalny DiNa, na skutek szybkiego uwolnienia do roztworu PBS powodował rozwinięcie powierzchni włókien PDLGA, przez co powstały pory przyspieszające degradację kopoliestru. Trudno rozpuszczalny sirolimus, wraz ze wzrostem swojej zawartości w matrycy dodatkowo zabezpieczał ją przed hydrolizą. Z tego względu, wypadkowa wszystkich oddziaływań w materiale niezmodyfikowanym za pomocą PCU spowodowała, że wraz ze zwiększeniem ilości DiNa i SLM, erozja przebiegała wolniej, biorąc pod uwagę włókninę jako całość. W przypadku próbek zawierających bardziej hydrofobowy PCU – ChronoSil, tendencja była odwrotna. Dzięki zwiększeniu ilości DiNa, w połączeniu z promowaną degradacją w masie, erozja była w tym przypadku najbardziej intensywna. Można podejrzewać, że w czasie 168 dni frakcja zawierająca łatwo rozpuszczalny lek, w dużej mierze uległa rozkładowi, pozostała natomiast część włókien PDLGA, w której pierwotnie znajdował się sirolimus. Zwiększenie ilości leków we włókninie zmodyfikowanej za pomocą HydroThane niemal nie wpłynęło na szybkość erozji, gdyż różnice Δm PDLGA pomiędzy próbkami zawierającymi 5% i 10% substancji aktywnych były mniejsze niż 2%. Obserwacja ta potwierdza heterogeniczny charakter erozji i degradacji w tym materiale.

15.1.4. Badanie zmian średnich mas molowych oraz dyspersyjności PDLGA podczas degradacji hydrolitycznej

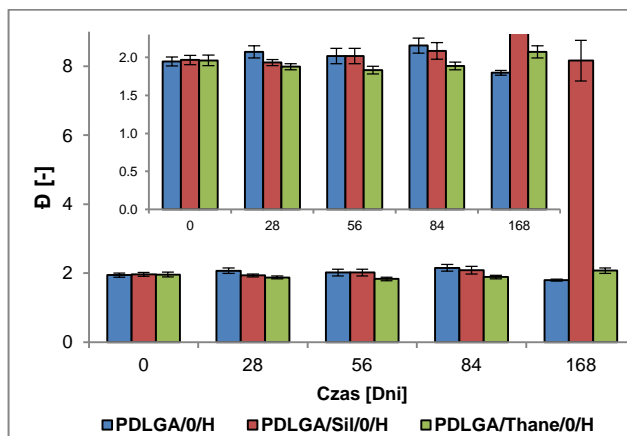
W celu zbadania szybkości degradacji hydrolitycznej PDLGA, metodą chromatografii wykluczenia (żelowej) wyznaczono zmiany liczbowo średniej masy molowej \overline{M}_n , wagowo średniej masy molowej \overline{M}_w oraz dyspersyjności. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 40 oraz Rys. 41. Analizowano jedynie te materiały, do których nie wprowadzono uprzednio leków, ponieważ substancje aktywne wykazywały interakcję z kolumną chromatograficzną, co mogło prowadzić do przekłamań uzyskanych wyników.

Zaobserwowano, że najszybciej degradowała niezmodyfikowana włóknina odniesienia PDLGA/0/H. W czasie 84 dni nastąpił spadek wartości \overline{M}_n i \overline{M}_w odpowiednio z 40600 ± 900 g/mol do 11700 ± 600 g/mol i 79100 ± 2400 g/mol do 23100 ± 1100 g/mol. W tym czasie dyspersyjność PDLGA nieznacznie się zwiększyła z $\overline{D}=1,95\pm 0,06$ do $\overline{D}=2,16\pm 0,10$. Obserwowane na obrazach SEM spęczenie włókien i uszczelnienie powierzchni włókniny (Rys. 31B) mogło w pewnym stopniu utrudnić odprowadzanie kwaśnych produktów degradacji kopoliestru do medium degradacyjnego. Były

to warunki sprzyjające autokatalizie reakcji hydrolizy wiązań estrowych, przyspieszającej proces rozerwania łańcuchów polimerowych. Po 168 dniach, na skutek erozji włóknina uległa całkowitemu rozpadowi, a powstałe oligomery zostały przetransportowane do roztworu PBS. W tym przypadku analizę metodą chromatografii GPC przeprowadzono po usunięciu wody z wykorzystaniem procesu liofilizacji oraz po pięciokrotnej ekstrakcji produktów degradacji przy użyciu chloroformu. Zaobserwowano powstanie frakcji oligomerów o niewielkim stopniu polimeryzacji, gdzie \overline{M}_n wynosiło 500 ± 200 g/mol, a \overline{M}_w 900 ± 200 g/mol.



Rys. 40. Zmiany liczbowo średniej masy molowej (\overline{M}_n) oraz wagowo średniej masy molowej (\overline{M}_w) PDLGA w czasie degradacji hydrolitycznej ($\bar{x} \pm SD$; N=3)



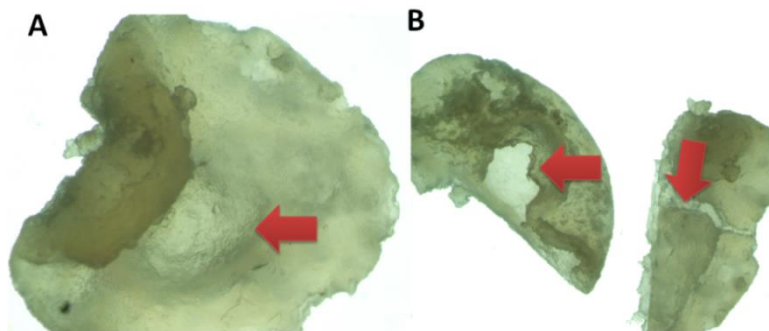
Rys. 41. Zmiany dyspersyjności PDLGA w czasie degradacji hydrolitycznej ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Wprowadzenie nanowłóknien ChronoSil, do 56 dnia inkubacji nie wpłynęło na szybkość zmian \overline{M}_n kopoliestru w porównaniu do referencyjnej włókniny PDLGA/0/H. Wartości \overline{M}_w zmniejszały się w tym czasie najszybciej spośród badanych materiałów, chociaż różnice były niewielkie. Świadczyło to o nieco szybszym rozkładzie frakcji wysokocząsteczkowej względem pozostałych materiałów, przy równoczesnym usunięciu do otoczenia pewnej części oligomerów, co potwierdza wartość ubytku wagowego Δm PDLGA (Rys. 38) oraz dyspersyjność \overline{D} , która w tym okresie miała nieco niższe wartości (Rys. 41). W dalszej części eksperymentu degradacja PDLGA w próbce PDLGA/Sil/0/H

zwolniła. Po 84 dniach wartości \overline{M}_n i \overline{M}_w wynosiły odpowiednio 12800 ± 500 g/mol i 26600 ± 1100 g/mol, a po 168 dniach różnica w odniesieniu do materiału referencyjnego była zdecydowanie bardziej zauważalna. Liczbowo średnia masa molowa wynosiła 2400 ± 300 g/mol a wagowo średnia masa molowa 19400 ± 400 g/mol. Dyspersyjność w tym czasie znacznie wzrosła z $2,08 \pm 0,11$ po 84 dniach do $8,60 \pm 0,59$ po zakończeniu inkubacji (Rys. 41). Wynik ten, był uśrednioną wartością uzyskaną dla całej pozostałości PDLGA we włókninie. W rzeczywistości uzyskano bimodalny rozkład mas molowych, gdzie jedna z frakcji posiadała średnie masy zbliżone do materiału wyjściowego (\overline{M}_w 81400 ± 1200 g/mol; \overline{M}_n $1,47 \pm 0,04$) a druga, większa, składała się z niskocząsteczkowych produktów degradacji (\overline{M}_w 3900 ± 200 ; \overline{M}_n $1,95 \pm 0,04$). Wyjaśnieniem tego wyniku może być gradientowa struktura włókniny, w której udział wagowy PCU wzrasta w kierunku środka próbki. Hydrofobowy charakter nanowłókien ChronoSil, ściśle oplatających mikrowłókna PDLGA mógł uniemożliwić dyfuzję wody do frakcji kopoliestru znajdującej się blisko rdzenia materiału. W rezultacie degradacja PDLGA w tym rejonie była niewielka. Z kolei w warstwach zewnętrznych włókniny, na skutek spęcznienia włókien i uszczelnienia powierzchni zewnętrznej mogło dojść do zaburzenia procesu dyfuzji kwaśnych produktów degradacji do roztworu PBS, co zwiększyło ich autokatalityczny wpływ na hydrolizę. Można zatem wywnioskować, że podobnie jak w przypadku włókniny PDLGA/0/H, wprowadzenie nanowłókien ChronoSil bardziej sprzyjało degradacji kopoliestru w masie, co potwierdza wcześniejsze obserwacje. Jednak w tym materiale, rozkład nie zachodził w jego całej objętości, a jedynie do pewnej odległości od powierzchni zewnętrznej. W ten sposób mogło dojść do tak dużego wzrostu dyspersyjności w badanym układzie i uzyskania bimodalnego rozkładu mas molowych.

Przeplot mikrowłókien PDLGA z nanowłóknami HydroThane spowodował najwolniejszy spadek wartości średnich mas molowych (Rys. 40). Po 84 dniach zaobserwowano, że \overline{M}_n i \overline{M}_w wynosiły odpowiednio 18400 ± 500 g/mol i 34700 ± 1000 g/mol, a po 168 dniach 8100 ± 300 g/mol i 16800 ± 400 g/mol). W czasie inkubacji dyspersyjność PDLGA ulegała jedynie niewielkim fluktuacjom. Przez 56 dni nastąpiło zmniejszenie \overline{M}_n z $1,98 \pm 0,07$ do $1,84 \pm 0,05$ co wskazywało na skuteczne usuwanie oligomerów do otoczenia, wynikające z bardzo dobrej zdolności do absorbowania wody oraz braku spęczniania włókien. W dalszym etapie eksperymentu dyspersyjność nieznacznie wzrosła, na skutek postępu hydrolizy oraz utrudniającego dyfuzję zmniejszenia się objętości wolnych przestrzeni pomiędzy włóknami, osiągając ostatecznie wartość $2,13 \pm 0,08$. Na podstawie uzyskanych wyników można potwierdzić wcześniejsze założenie, że łatwa dyfuzja kwaśnych produktów hydrolizy PDLGA oraz ich szybka neutralizacja przez bufor fosforanowy zawarty w medium degradacyjnym spowodowała, że degradacja kopoliestru we włókninie PDLGA/Thane/0/H zachodziła głównie na powierzchni włókien. Dobra wymiana masy z medium degradacyjnym ograniczyła efekt autokatalizy, co tłumaczy spowolnienie procesu rozkładu łańcuchów kopoliestru, w porównaniu do materiałów PDLGA/0/H i PDLGA/Sil/0/H. Przyczyną zmiany mechanizmu degradacji i erozji było najprawdopodobniej zwiększenie zdolności włókniny zawierającej HydroThane do wchłaniania roztworu buforu PBS. Neutralizacja powstających na froncie erozji heterogenicznej produktów degradacji spowodowała, że średnice włókien nie ulegały dużym zmianom, co pozwoliło na ich sprawny transport z wnętrza włókniny do medium degradacyjnego. Z drugiej strony, skurcz i spęcznienie włókien w pozostałych dwóch materiałach doprowadziły do tego, że przestały one

degradować jak włókniny, gdyż w dużym stopniu zmniejszył się ich stosunek powierzchni do objętości. Spowodowało to, że charakterystyczna dla poliestrów biodegradowalnych autokataliza hydrolizy wiązań estrowych miała w przypadku tych włókien większy udział. Skutkiem było powstawanie wnęk wypełnionych medium degradacyjnym wewnątrz struktury włókniny, co było szczególnie dobrze widoczne w przypadku materiału odniesienia (Rys. 42).



Rys. 42. Zdjęcie mikroskopowe (x10) wnęki powstałej na skutek erozji w masie, na przykładzie włókniny PDLGA/0/H, po 84 dniach degradacji hydrolitycznej. Na zdjęciu A przedstawiono próbkę przed przecięciem, a na B po przecięciu

Wprowadzenie poliuretanowych nanowłókien do włókniny PDLGA w obu wariantach spowodowało obniżenie szybkości procesu degradacji hydrolitycznej. Przyczyny uzyskanego efektu miały jednak różne źródło, w zależności od zastosowanego modyfikatora PCU. W przypadku materiału zawierającego hydrofobowy ChronoSil, wolniejszą degradację można było tłumaczyć wyższą hydrofobowością, która odbiła się na słabej zdolności do absorbowania wody przez tę włókninę. Silne spęcznienie włókien i uszczelnienie powierzchni zewnętrznej utrudniły procesy dyfuzyjne, w szczególności pod koniec eksperymentu. Skutkiem było zintensyfikowanie autokatalitycznego rozkładu łańcuchów PDLGA, przyspieszającego degradację, ponieważ mała ilość wchłoniętego buforu PBS była niewystarczająca do neutralizacji kwaśnych produktów hydrolizy. Efekt ten miał kluczowe znaczenie w początkowej fazie inkubacji, stąd szybsze zmiany \overline{M}_w . W przypadku materiału, do którego wprowadzono nanowłókna HydroThane, przyczyną spowolnienia degradacji było promowanie przez higroskopijny modyfikator PCU erozji powierzchniowej, która ze względu na marginalne znaczenie autokatalizy przebiegała wolniej. Zmiana mechanizmu degradacji wynikała w tym przypadku z bardzo dobrej chłonności włókniny, braku spęcznienia matrycy PDLGA oraz słabego uszczelnienia powierzchni materiału w czasie degradacji hydrolitycznej.

15.1.5. Badanie zmian składu molowego PDLGA w czasie degradacji hydrolitycznej

Na skutek hydrolizy, w poliestrach biodegradowalnych następuje rozpad wiązania estrowego. Oprócz zmiany długości łańcucha, wpływa to również na skład molowy, o ile do syntezy polimeru wykorzystano więcej niż jeden monomer. Spektroskopia NMR, została wykorzystana do analizy wpływu modyfikatorów w postaci nanowłókien PCU oraz leków na przebieg hydrolizy, która była głównym czynnikiem powodującym degradację PDLGA w przeprowadzonym eksperymencie.

Analizując dane zawarte w Tabeli 25, można zauważyć, że w czasie 84 dni inkubacji włókien nie zarejestrowano większych zmian składu molowego PDLGA. Prawdopodobnie wynikało to z semiblokowej mikrostruktury łańcucha polimerowego ($R = 0,52$). Biorąc pod uwagę statystykę, przy dość niewielkich wartościach średniej długości bloków laktydylowych ($L_{LL}^e 5,53$) i glikolidylowych ($L_{GG}^e 1,47$), można założyć, że wyraźne zmiany składu molowego mogą być widoczne dopiero przy zaawansowanym rozkładzie polimeru. Dzieje się tak, ponieważ nawet stosunkowo krótkie łańcuchy o opisanej strukturze, mogą mieć taki sam skład molowy jak łańcuchy o wysokiej masie molowej. Ponadto pomiar metodą NMR uśrednia wynik uzyskany dla wszystkich łańcuchów w polimerze. Przedłużenie obserwacji do 168 dni spowodowało, że można było zaobserwować zmiany, wynikające zarówno z obecności leków jak i modyfikatorów PCU (Tabela 25).

Tabela 25. Zmiany składu molowego kopoliestru PDLGA podczas degradacji hydrolytycznej

Skład włókniny	Stosunek molowy LL : GG [%]				
	Dzień 0	Dzień 28	Dzień 56	Dzień 84	Dzień 168
PDLGA/0/H	79:21	79:21	79:21	80:20	97:3
PDLGA/5/H	79:21	79:21	79:21	80:20	84:16
PDLGA/10/H	79:21	79:21	79:21	79:21	82:18
PDLGA/Sil/0/H	79:21	79:21	79:21	79:21	83:17
PDLGA/Sil/5/H	79:21	79:21	79:21	80:20	81:19
PDLGA/Sil/10/H	79:21	79:21	79:21	79:21	81:19
PDLGA/Thane/0/H	79:21	79:21	79:21	79:21	81:19
PDLGA/Thane/5/H	79:21	79:21	79:21	81:19	83:17
PDLGA/Thane/10/H	79:21	79:21	79:21	79:21	82:18

We włókninach niezawierających leków, zmiana składu molowego PDLGA po 84 dniach degradacji wystąpiła tylko w przypadku materiału odniesienia i było to zaledwie 1% mol. W pozostałych próbkach nie zarejestrowano żadnych zmian. Na podstawie wyników uzyskanych w czasie innych analiz stwierdzono, że obecność nanowłókien PCU spowodowała spowolnienie degradacji PDLGA. Badanie metodą NMR przeprowadzone po 168 dniach potwierdziło to założenie. Zgodnie z przewidywaniami, w niezmodyfikowanej włókninie odniesienia udział molowy jednostek glikolidylowych uległ znacznemu zmniejszeniu, ze względu na ich większą hydrofilowość, a co za tym idzie, podatność na hydrolizę. Zmiana ta wynosiła 18% mol i stanowiła najwyższą wartość uzyskaną w tym eksperymencie. Wprowadzenie frakcji nanowłókien ChronoSil oraz HydroThane spowodowało, że udział molowy mikrobloków glikolidylowych zmniejszył się odpowiednio o 4% mol i 2% mol. Uzyskane wyniki odpowiadały rezultatom uzyskanym metodą GPC i potwierdzały spowolnienie procesu degradacji hydrolytycznej kopoliestru na skutek zmiany hydrofilowości włókniny oraz zaburzenia procesów dyfuzyjnych w jej obrębie. Tak duża różnica pomiędzy wartościami uzyskanymi dla próbki odniesienia oraz materiałów zmodyfikowanych wynikała z silnego rozkładu materiału PDLGA/0/H na skutek czego, polimer rozpadł się na oligomery (Rys. 40). Przy tak niewielkiej masie molowej, statystyka pozwoliła na obserwację zmiany składu molowego kopolimeru o opisanej uprzednio mikrostrukturze. Na wynik uzyskany dla materiału PDLGA/Sil/0/H wpływ miało uśrednienie

składu dla dwóch frakcji znacznie różniących się masami molowymi, zaś w przypadku PDLGA/Thane/0/H degradacja zachodziła zbyt powoli, aby zaobserwować większe zmiany stosunku molowego komonomerów.

Wprowadzenie do włókien po 5% SLM i DiNa również wpłynęło na przebieg degradacji hydrolitycznej PDLGA. W przypadku próbek uwalniających substancje aktywne należy pamiętać, że początkowo oba leki były obecne w układzie, każdy po innej ze stron włókniny. Ich uwalnianie odbywało się z różną szybkością, zaś analiza metodą spektroskopii NMR była przeprowadzona dla całej próbki, więc uzyskany wynik należy traktować jako średni skład molowy uzyskany zarówno dla włókien zawierających pierwotnie łatwo rozpuszczalną sól sodową diklofenaku jak i trudno rozpuszczalny w wodzie sirolimus.

W czasie 84 dni inkubacji, wpływ leków na stosunek molowy jednostek laktydylowych do glikolidylowych w kopoliestrze ponownie był nieznaczny. Wzrost udziału bloków pochodzących od D,L-laktydu wynosił 1%, 1% i 2% mol odpowiednio dla włókniny PDLGA/5/H, PDLGA/Sil/5/H i PDLGA/Thane/5/H. Wynikał on najprawdopodobniej z obecności DiNa, który po uwolnieniu do otoczenia powodował powstawanie porów, i w rezultacie przyspieszał proces degradacji hydrolitycznej poprzez rozwinięcie powierzchni właściwej włókien. Jednak, w dalszej części eksperymentu hydrofobowy sirolimus, ciągle znajdujący się w badanym układzie wywierał większy wpływ na uzyskane wyniki. W tym miejscu, warto odnieść się do obrazów uzyskanych metodą mikroskopii SEM. W zależności od rodzaju wprowadzonego do włókien leku, różnice w morfologii powierzchni i stopniu jej erozji były wyraźnie widoczne. Można również przypuszczać, że stosunek wagowy włókien PDLGA zawierających DiNa i SLM uległ w trakcie degradacji dużym zmianom, na korzyść frakcji zawierającej hydrofobową rapamycynę. Pomimo założenia, że sól sodowa diklofenaku przyspiesza erozję matrycy, to jednak ilościowe określenie tego założenia nie było możliwe.

Po 168 dniach zaobserwowano, że włóknina PDLGA/5/H nie uległa całkowitej dezintegracji, co miało miejsce w przypadku niezawierającego leków materiału odniesienia. Zmiana składu molowego była w tym przypadku znacznie mniejsza. Udział jednostek glikolidylowych zmniejszył się o 5% mol, co świadczyło o spowolnieniu degradacji hydrolitycznej PDLGA, za co najprawdopodobniej odpowiadał sirolimus. Odnosząc się do ubytku wagowego zmierzonego dla matrycy w próbce PDLGA/5/H można podejrzewać, że frakcja włókien kopoliestru, która pierwotnie zawierała DiNa, uległa niemal całkowitej erozji. Stąd mniejsza zmiana składu molowego w porównaniu do włókniny referencyjnej. Podobne tendencje można było zaobserwować analizując wyniki uzyskane dla materiału zawierającego hydrofobowy ChronoSil. W tym przypadku, również wystąpiła silna erozja mikrowłókien zawierających pierwotnie DiNa, czego nie zaobserwowano, dla frakcji, do której wprowadzono SLM (Rozdział 15.1.1). Uśredniony skład molowy, który uzyskano po 168 dniach najprawdopodobniej dotyczył słabo zdegradowanej części włókniny hydrofobizowanej przez rapamycynę. Dodatkowo, uszczelnienie powierzchni zabezpieczyło w pewnym stopniu przed hydrolizą część materiału zamkniętą w blisko rdzenia struktury włókniny. W przypadku próbek zawierających HydroThane, zmiana składu molowego kopoliestru po 168 dniach była większa i wynosiła 4% mol. Na pierwszy rzut oka może to stanowić pewien paradoks, gdyż jak wcześniej stwierdzono, HydroThane najbardziej spowalniał proces degradacji hydrolitycznej, ze względu na promowanie

powierzchniowego charakteru tego procesu. Jednak, łatwo rozpuszczalna sól sodowa diklofenaku w połączeniu z silną absorpcją wody mogła spowodować, że degradacja przyspieszyła, przynajmniej w omawianej warstwie włókniny PDLGA. Świadczyła o tym wartość średniego ubytku wagi kopoliestru we włókninie PDLGA/Thane/5/H, który po 168 dniach miał mniejszą wartość, niż w przypadku włókniny niezmodyfikowanej nanowłóknami PCU, lecz jednocześnie większą, niż dla materiału, do którego wprowadzono hydrofobowy ChronoSil (Rys. 39).

Zwiększenie stężenia leków w matrycy do 10% spowodowało, że w czasie 84 dni degradacji hydrolitycznej nie zaobserwowano żadnych zmian składu molowego PDLGA. Ta obserwacja wynikała z nałożenia się wpływu wspomnianej wcześniej mikrostruktury kopoliestru oraz działania substancji aktywnych na degradację. Duża porowatość włókien matrycy, do których wprowadzono łatwo rozpuszczalny DiNa, pomimo ewidentnego przyspieszenia rozkładu, umożliwiła również łatwiejsze odprowadzanie do otoczenia niskocząsteczkowej frakcji oligomerów. Z drugiej strony silniejsza hydrofobizacja matrycy za pomocą SLM spowodowała spowolnienie transportu wody do materiału. Uniemożliwiło to zajście hydrolizy w takim stopniu, by zmniejszenie masy molowej PDLGA było na tyle znaczące, aby zaobserwować zmianę składu molowego. Po 168 dniach, różnice były już widoczne, jednak w dalszym ciągu niewielkie. Po dwukrotnym zwiększeniu zawartości leków w nośniku, w przypadku próbek PDLGA/10/H i PDLGA/Thane/10/H zawartość bloków laktydylowych w kopolimerze wzrosła o 3% mol, zaś w dla włókniny zawierającej nanowłókna ChronoSil o 2% mol.

Na podstawie analizy wyników uzyskanych metodą spektroskopii NMR, można było zauważyć, że zarówno poliuretanowe nanowłókna, jak i obecność oraz stężenie leków w matrycy, miały kluczowy wpływ na przebieg hydrolizy PDLGA w badanych włókninach. Finalnie, każdy z wprowadzonych czynników spowodował jednak, że zmiany składu molowego w kopolimerze były mniejsze, co wynikało ze spowolnienia procesu degradacji po wprowadzaniu modyfikatorów PCU jak i hydrofobowego sirolimusu. Zaobserwowane zamiany wynikały w dużej mierze ze sposobu hydrolizy kopoliestru, będącego skutkiem jego mikrostruktury, a także specyfiki pomiaru NMR, uśredniającego wynik dla wszystkich łańcuchów PDLGA obecnych w próbce, zarówno oligomerów jak i tych, które tylko w niewielkim stopniu zmniejszyły swoją masę molową, co wpłynęło na uzyskane wyniki.

15.1.6. Analiza zmian właściwości termicznych PDLGA w czasie degradacji hydrolitycznej

Zmiany właściwości termicznych PDLGA podczas degradacji hydrolitycznej mierzono analizując przesunięcie temperatury zeszklenia (T_g) kopoliestru, na podstawie drugiego przebiegu pomiaru DSC, po stopieniu włókniny i jej gwałtownym schłodzeniu. W przypadku próbek zawierających substancje aktywne oraz poliuretanowy modyfikator, otrzymany wynik stanowił wypadkową składu, ponieważ włókniny badano jako całość, bez ekstrakcji frakcji biodegradowalnej, aby nie usuwać historii przetwórczej (pierwszy pomiar DSC), pozwalającej na obserwację relaksacji w okolicach przejścia szklistego. Wpływ modyfikatorów PCU na wartość temperatury zeszklenia był niewielki. Zaobserwowano jednak ich częściową mieszalność termodynamiczną z PDLGA [261]. Przejawiała się ona obniżeniem T_g kopoliestru, ponieważ wartość tego parametru dla obu PCU była o wiele niższa. Wynosiła $-30\text{ }^\circ\text{C}$ w przypadku ChronoSilu oraz $-4\text{ }^\circ\text{C}$ dla HydroThane. Na termogramach obserwowano dwa przejścia szkliste, pochodzące od obu polimerów. Za pomocą równania Foxa

(Równanie 40), możliwe było obliczenie, w jakim stopniu oba polimery były ze sobą mieszalne [262]. W przypadku ChronoSilu był to 1% wag., zaś w przypadku HydroThane 4%. Kompatybilność wykazywały najprawdopodobniej frakcje o najniższej masie molowej.

Wprowadzenie leków dało podobny efekt, polegający na obniżeniu T_g PDLGA, skutkujący jego plastyfikacją. Zarówno sirolimus jak i sól sodowa diklofenaku wykazywały przejście szkliste, co świadczyło o tym, że leki te nie były całkowicie krystaliczne. W pierwszym biegu pomiaru DSC, prowadzonym do temperatury 200 °C tylko SLM uległ stopieniu. DiNa ze względu na budowę jonową wykazywał bardzo wysoką temperaturę topnienia, powyżej 280 °C. W drugim biegu DSC, po gwałtownym schłodzeniu ciekłym azotem wyznaczono, że T_g SLM wynosiło 40 °C, a DiNa -54 °C, co świadczyło o częściowej amorfizacji obu leków. DiNa nie uległ uprzednio stopieniu, więc w dalszym ciągu wykazywał głównie strukturę krystaliczną. Jednak w przypadku SLM nie zaobserwowano krystalizacji w zakresie do 200 °C. Uzyskanie struktury amorficznej leków zostało opisane w literaturze, na przykład w pracy Capos *et al.*, dotyczącej amorficznej formy sirolimusu [263]. Analizując przebieg krzywych termicznych otrzymanych włókien, nie zaobserwowano charakterystycznych punktów przegięcia odpowiadających wprowadzonym lekom, co mogło świadczyć o ich pewnej kompatybilności z matrycą. Ich obecność w nośniku nie miała jednak większego wpływu na przebieg początkowego etapu eksperymentu, ponieważ obniżenie temperatury zeszklenia nie było na tyle duże żeby przeprowadzić matrycę w stan lepkosprężysty w 37 °C. Można więc założyć, że wprowadzenie substancji aktywnych miało główny wpływ na proces degradacji hydrolytycznej dopiero w późniejszej fazie eksperymentu, po zwiększeniu porowatości matrycy. Zaobserwowano jednak, że w początkowym okresie inkubacji (do 7 dnia) nastąpił niewielki wzrost T_g (Tabela 26). Wynikał on najprawdopodobniej z uwolnienia łatwo rozpuszczalnego DiNa, który działał jak niskocząsteczkowy plastyfikator. Za tym stwierdzeniem przemawia brak podobnego efektu w przypadku materiałów niezawierających substancji aktywnych.

Tabela 26. Zmiany wartości T_g PDLGA podczas degradacji hydrolytycznej włókien

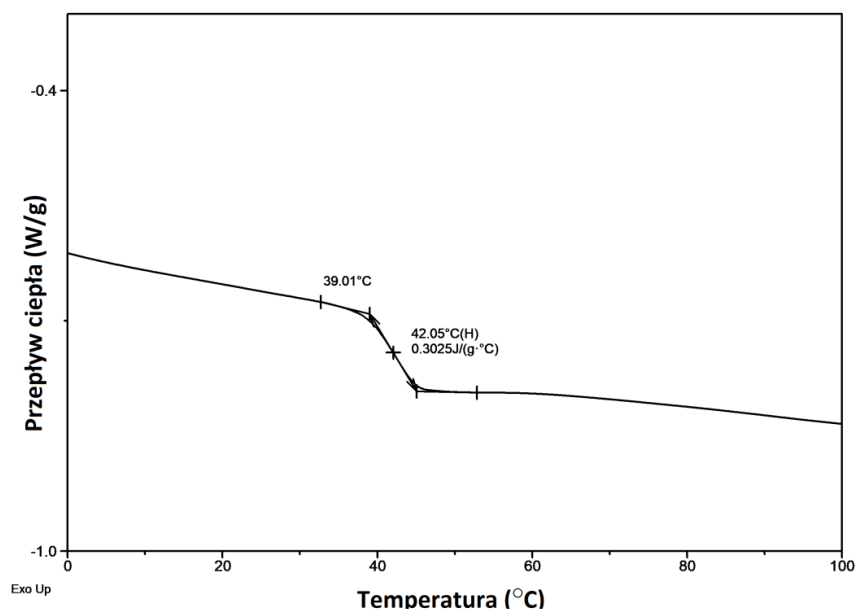
Skład włókniny	Temperatura zeszklenia T_g [°C]									
	0	3 d	7 d	14 d	28 d	42 d	56 d	70 d	84 d	168 d
PDLGA/0/H	54	53	53	53	52	52	52	51	49	-*
PDLGA/5/H	50	51	52	51	51	50	50	49	48	48
PDLGA/10/H	49	52	51	51	51	51	51	51	50	49
PDLGA/Sil/0/H	53	53	53	52	52	52	52	50	50	42
PDLGA/Sil/5/H	51	52	51	50	49	49	49	48	49	52
PDLGA/Sil/10/H	50	51	50	48	48	48	48	47	47	51
PDLGA/Thane/0/H	51	51	51	51	51	51	51	51	51	50
PDLGA/Thane/5/H	50	50	51	51	51	51	51	51	51	49
PDLGA/Thane/10/H	48	50	50	50	50	50	50	50	50	49

*całkowita degradacja próbki – zbyt mała ilość materiału do przeprowadzenia analizy;

$$\frac{1}{T_{g \text{ PDLGA/PCU}}} = \frac{W_{\text{PDLGA}}}{T_{g \text{ PDLGA}}} + \frac{W_{\text{PCU}}}{T_{g \text{ PCU}}} \quad (40)$$

gdzie: W_{PDLGA} – ułamek wagowy PDLGA; W_{PCU} – ułamek wagowy PCU;

W czasie 84 dni, największe przesunięcie T_g PDLGA zaobserwowano w przypadku włókniny referencyjnej, niezawierającej nanowłókien PCU oraz leków. Wynosiło ono 5 °C i było skutkiem pojawienia się frakcji oligomerów, powstałych w wyniku hydrolizy. Ze względu na całkowitą degradację polimeru po 168 dniach, ilość pozostałego materiału nie pozwoliła na przeprowadzenie analizy metodą DSC. We włókninie zawierającej nanowłókna hydrofobowego ChronoSilu, T_g kopoliestru również uległo obniżeniu, jednak w mniejszym stopniu niż w przypadku materiału PDLGA/0/H (Tabela 26). Zawartość niskocząsteczkowej frakcji była więc niższa, co potwierdzały wyniki uzyskane metodą GPC, świadczące o spowolnieniu degradacji PDLGA. Oba materiały wykazywały tendencje do pęcznienia włókien i uszczelniania powierzchni. Zjawiska te utrudniały transport produktów degradacji do medium inkubacyjnego. Z tego względu, procesy dyfuzyjne miały w tym przypadku podobny wpływ na zawartość niskocząsteczkowej frakcji w materiale. Po 168 dniach zaobserwowano, że T_g włókniny PDLGA/Sil/0/H było najniższe z pośród zbadanych i wynosiło 42 °C, czyli o 11 °C mniej niż pierwotnie. Silna plastyfikacja wynikała z nagromadzenia się dużej ilości małowcząsteczkowych produktów degradacji ze względu na skurcz włókien i uszczelnienie powierzchni materiału, a także z powodu obniżenia średniej masy molowej polimeru. Zakres przejścia szklistego niemal pokrywający się z temperaturą inkubacji doprowadził do płynięcia kopoliestru i całkowitej utraty struktury włóknistej (Rys. 31E, Rys. 43).



Rys. 43. Termogram DSC przedstawiający zakres przejścia szklistego PDLGA we włókninie PDLGA/Sil/0/H po 168 dniach

W przypadku włókniny zmodyfikowanej za pomocą nanowłókien HydroThane, sytuacja wyglądała zupełnie inaczej. W czasie 84 dni T_g nie uległo zmianie i wynosiło 51 °C, pomimo zmniejszenia

średniej masy molowej w tym czasie. Przyczyną, uzyskanego rezultatu był sprawny transport produktów degradacji do roztworu PBS, wynikający ze znacznego wzrostu chłonności wody oraz braku uszczelnienia powierzchni włókniny i spęcznienia włókien. Z tego względu nie zaobserwowano efektu plastyfikacji. Powyższe stwierdzenie potwierdzała dyspersyjność kopoliestru, która w tym czasie uległa zmniejszeniu, co świadczyło o usuwaniu niskocząsteczkowej frakcji polimeru z badanego układu (Rys. 41). Co więcej, spowolniona w omawianym materiale degradacja PDLGA nie sprzyjała obniżaniu T_g . Po 168 dniach dyspersyjność wzrosła do $2,13 \pm 0,08$, a wartość temperatury zeszklenia zmniejszyła się o $1\text{ }^\circ\text{C}$, co zapewne wynikało z zapadnięcia się struktury włókniny i zamknięcia pewnej, niewielkiej ilości produktów degradacji wewnątrz. Biorąc pod uwagę, że w materiale wciąż pozostało niemal 75% pierwotnej wagi włókien PDLGA, można przypuszczać, że wydłużając eksperyment, możliwa byłaby obserwacja zmiany mechanizmu degradacji i erozji na homogeniczny, w którym autokataliza odgrywałaby kluczową rolę.

Zaobserwowano, że wprowadzenie leków do matrycy również wpłynęło na zmianę właściwości termicznych PDLGA w czasie degradacji. W przypadku włókniny niezmodyfikowanej nanowłóknami PCU, która zawierała po 5% wag. leków, T_g po głównej fazie uwalniania soli sodowej diklofenaku wzrosło z $50\text{ }^\circ\text{C}$ do $52\text{ }^\circ\text{C}$ w czasie 7 dni. Później jednak zaczęło spadać i po 84 dniach wynosiło $48\text{ }^\circ\text{C}$. Po 168 dniach wartość ta nie uległa dalszej zmianie, nie zaobserwowano również całkowitej degradacji, jak w przypadku włókniny referencyjnej. Prawdopodobnie stało się tak ze względu na obecność hydrofobowego sirolimusu, utrudniającego hydrolizę łańcuchów PDLGA. Obrazy SEM wskazywały jednak na silną degradację włókien kopoliestru zawierających DiNa. Można zatem podejrzewać, że końcowy wynik uzyskano głównie dla frakcji zawierającej SLM.

W przypadku włókniny PDLGA/Sil/5/H przebieg zmian T_g był początkowo zbliżony do materiału PDLGA/5/H. Zaobserwowano również wzrost temperatury zeszklenia związany z uwolnieniem DiNa, po którym następował powolny spadek jej wartości do 70 dnia, po czym wartość T_g ponownie zaczęła rosnąć i po 168 dniach wynosiła $52\text{ }^\circ\text{C}$, co było równe wartości początkowej. Można przypuszczać, że udział wagowy frakcji zawierającej DiNa zmniejszał się dużo szybciej w trakcie degradacji hydrolitycznej, niż udział włókien zawierających SLM. Prawdopodobnie po 168 dniach we włókninie pozostała niemal wyłącznie frakcja PDLGA zawierająca rapamycynę, która spowolniła degradację kopoliestru ze względu na swoją hydrofobowość. Co więcej, bardziej hydrofobowy ChronoSil sprzyjał zahamowaniu degradacji tej części włókniny, stąd powrót T_g do wartości początkowej. Właściwości termiczne PDLGA w materiale zmodyfikowanym za pomocą nanowłókien HydroThane nie różniły się zbyt wiele od zarejestrowanych dla materiału bez leków. Zaobserwowano wyraźną stabilizację temperatury zeszklenia w czasie 84 dni, natomiast po 168 dniach pojawiła się niewielka plastyfikacja kopoliestru, która najprawdopodobniej wynikała z przyspieszenia degradacji na skutek rozwinięcia powierzchni właściwej włókien PDLGA po uwolnieniu DiNa i zmniejszenia masy molowej kopoliestru. Również w tym przypadku struktura włóknista materiału została zachowana, co sprzyjało transportowi produktów degradacji do otoczenia i tym samym zmniejszyło ostateczny efekt plastyfikacji.

Zastosowanie 10% stężenia leków w matrycy PDLGA spowodowało jeszcze większe obniżenie temperatury zeszklenia kopoliestru w wyjściowych materiałach. Potwierdzało to tezę, o mieszalności termodynamicznej nośnika z wprowadzonymi substancjami aktywnymi oraz o ich plastyfikującym

działaniu. Ponownie, szybkie uwolnienie łatwo rozpuszczalnej soli sodowej diklofenaku spowodowało wzrost T_g we wszystkich rozpatrywanych przypadkach po 3 dniach trwania eksperymentu (Tabela 26). Tendencje zmian T_g , które zarejestrowano po zwiększeniu zawartości leków w matrycy były analogiczne z uzyskanymi wcześniej. Jedynie w przypadku materiału niezawierającego PCU zaobserwowano pewne różnice. Mianowicie, podczas 84 dni inkubacji wartość T_g zmniejszyła się jedynie o 2 °C, przy 5 °C i 4 °C odpowiednio dla PDLGA/0/H i PDLGA/5/H. Zjawisko to tłumaczyła zwiększona ilość leków w badanym układzie, przede wszystkim DiNa, którego podwyższone stężenie w matrycy spowodowało silną erozję powierzchni (Rys. 34B), ułatwiającą dyfuzję produktów degradacji do otoczenia. Z drugiej strony większa ilość hydrofobowego SLM jeszcze bardziej spowolniła degradację włókien PDLGA, przez co mniejsza ilość oligomerów była obecna w układzie podczas badania. Modyfikatory w postaci nanowłókien PCU zadziałały w identyczny sposób jak w przypadku zastosowania 5% stężenia leków w nośniku. Wykorzystanie bardziej hydrofobowego ChronoSilu wywołało te same efekty, związane z pęcznieniem włókien oraz uszczelnianiem powierzchni próbek, czego nie obserwowano przy użyciu nanowłókien HydroThane. W pierwszym przypadku zmiana T_g po 84 dniach ponownie była wyższa i wynosiła 4 °C, co było największą wartością przesunięcia temperatury zeszklenia pośród badanych materiałów zawierających po 10% wag. leków, w drugim zaś, nie zarejestrowano zmian tego parametru. Po 168 dniach temperatura przejścia szklistego w przypadku włókniny PDLGA/10/H uległa zmniejszeniu o 1 °C, podobnie jak w przypadku PDLGA/Thane/10/H. W materiale zawierającym nanowłókna T_g ChronoSil ponownie wzrosło, osiągając wartość wyjściową.

Uzyskane wyniki potwierdziły różnice w mechanizmach degradacji w zależności od wykorzystanego modyfikatora PCU, przede wszystkim ze względu na różny stopień plastyfikacji kopoliestru niskocząsteczkowymi produktami hydrolizy. Świadczyły również o efektywności procesów transportu masy w poszczególnych włókninach. Wpływ leków na właściwości termiczne również był zauważalny. Wprowadzenie DiNa sprzyjało powstawaniu frakcji oligomerów, ze względu na rozwinięcie powierzchni włókien PDLGA, co jednocześnie pomagało w ich dyfuzji do medium degradacyjnego. SLM działał w odwrotny sposób, utrudniając hydrolizę i tym samym rozrywanie łańcuchów. Nagromadzenie oligomerów w materiale, rzutujące na jego właściwości termiczne, zależało przede wszystkim od łatwości zachodzenia procesów dyfuzyjnych w obrębie włókniny.

15.1.7. Wyznaczanie profili uwalniania leków

Sirolimus oraz sól sodową diklofenaku uwalniano z włókien PDLGA do wodnego roztworu PBS w temperaturze 37 °C. Początkowe stężenie leków w matrycy wynosiło 5% oraz 10% wag. Zaobserwowano, że hydrofilowość nanowłókien PCU wprowadzonych do włókniny w roli modyfikatora szybkości uwalniania substancji aktywnych miała istotny wpływ na kinetykę procesu oraz przebieg profili uwalniania. Eksperyment prowadzono przez 84 dni. Skumulowane uwalnianie SLM i DiNa przedstawiono w % wag. Efektywność enkapsulacji leków we włóknach PDLGA zestawiono w Tabela 27.

Tabela 27. Wydajność enkapsulacji leków wyrażona w µg leku przypadającą na 1 mg PDLGA ($\bar{x}\pm SD$; N=5)

Skład włókniny	Zawartość sirolimusu		
	$m_{\text{roztwór}}$ [µg/mg]	$m_{\text{włóknina}}$ [µg/mg]	$W_{\text{enkapsulacji}}^*$ [%]
PDLGA/5/H	52,94±0,51	51,62±0,43	97,51±0,13
PDLGA/10/H	111,21±0,23	110,58±0,22	99,43±0,33
PDLGA/Sil/5/H	51,55±0,29	49,92±0,48	96,84±0,42
PDLGA/Sil/10/H	108,84±0,49	107,69±0,32	98,94±0,18
PDLGA/Thane/5/H	50,90±0,36	48,38±0,19	95,05±0,30
PDLGA/Thane/10/H	108,65±0,22	107,18±0,15	98,65±0,06
Skład włókniny	Zawartość soli sodowej diklofenaku		
	$m_{\text{roztwór}}$ [µg/mg]	$m_{\text{włóknina}}$ [µg/mg]	$W_{\text{enkapsulacji}}^*$ [%]
PDLGA/5/H	52,66±0,45	51,84±0,31	98,44±0,35
PDLGA/10/H	111,13±0,64	110,67±0,44	99,58±0,40
PDLGA/Sil/5/H	53,99±0,11	53,91±0,29	99,85±0,10
PDLGA/Sil/10/H	111,47±0,77	110,29±0,81	98,94±0,69
PDLGA/Thane/5/H	51,63±0,63	50,61±0,66	98,02±0,85
PDLGA/Thane/10/H	110,02±0,80	108,86±0,70	98,95±0,64

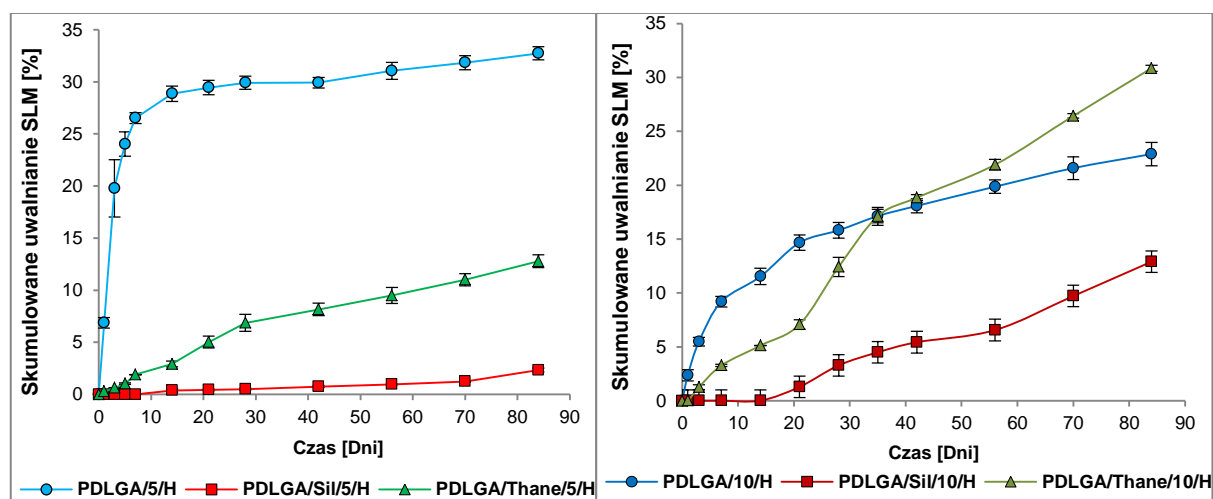
$m_{\text{roztwór}}$ – ilość leku przypadająca na 1 mg PDLGA w roztworze; $m_{\text{włóknina}}$ – ilość leku przypadająca na 1 mg PDLGA we włókninie; W_e – wydajność enkapsulacji wyrażona równaniem $W_e = (m_{\text{włóknina}}/m_{\text{roztwór}}) \cdot 100$;

15.1.7.1. Wyznaczanie profili uwalniania sirolimusu (SLM)

Uwalnianie sirolimusu z mikrowłókien PDLGA zawierających 5% wag. leku zachodziło powoli (Rys. 44). Najszybsze uwalnianie uzyskano w przypadku niezmodyfikowanej włókniny referencyjnej. Po 84 dniach uwolniło się jednak jedynie 33±1% początkowej ilości rapamycyny, co odpowiadało 16,90±0,32 µg SLM przypadającego na 1 mg nośnika PDLGA (oznaczone w dalszej części tekstu jako µg/mg). Uzyskano dwufazowy profil uwalniania. W początkowym etapie trwającym 7 dni uwolniło się 24±1% leku, co odpowiadało dawce 12,40 µg/mg i stanowiło aż 73% z całości rapamycyny uwolnionej podczas eksperymentu. Pozostała ilość SLM uwalniała się bardzo powoli. Od 21 dnia do końca trwania eksperymentu, średnia dawka sirolimusu uwalniana tygodniowo wynosiła 0,40±0,14 µg/mg. Obserwacje te świadczyły najprawdopodobniej o występowaniu oddziaływań leku z matrycą. Uzyskany profil uwalniania był najbardziej zgodny modelem kinetyki pierwszego rzędu (Tabela 28), co świadczyło o zależności szybkości procesu od zawartości leku w matrycy, gradientu jego stężenia pomiędzy warstwą statyczną (opisaną w Rozdziale 4.2.2), a roztworem PBS oraz od czasu.

Wprowadzenie modyfikatorów PCU drastycznie zmieniło profile uwalniania SLM z mikrowłókien PDLGA. Zarówno w przypadku nanowłókien ChronoSil jak i HydroThane zaobserwowano znaczne zmniejszenie szybkości uwalniania, co pokazują obliczone stałe szybkości z wybranych modeli kinetycznych (spełniających założony warunek wartości skorygowanego współczynnika determinacji R_{adj}^2 0,95) (Tabela 28). Przebieg profili uwalniania w obu przypadkach był jednoetapowy i zbliżony do liniowego, co świadczyło o uwalnianiu bardziej równomiernych dawek SLM, niż w przypadku włókniny PDLGA/5/H. Co więcej, modyfikacja za pomocą ChronoSilu spowodowała 14 dniowy okres początkowej inhibicji uwalniania, natomiast w przypadku HydroThane lek uwalniał się powoli od 1 dnia

eksperymentu. Po 84 dniach, ilość uwolnionego SLM była bardzo niska w obu przypadkach, w szczególności dla włókniny PDLGA/Sil/5/H, gdzie wyniosła jedynie $2,18 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{mg}$. Dla PDLGA/Thane/5/H było to zaś $13 \pm 1\%$ ($6,18 \pm 0,30 \mu\text{g}/\text{mg}$), czyli niemal trzykrotnie mniej niż dla włókniny referencyjnej, jednak ponad sześć razy więcej niż w przypadku drugiego wariantu modyfikacji. Dla materiału zawierającego nanowłókna ChronoSil w żadnym modelu kinetycznym nie uzyskano założonej minimalnej wartości R_{adj}^2 wynoszącej 0,95. Niemniej jednak, najlepsze dopasowanie wykazywało uwalnianie zgodne z kinetyką zerowego rzędu (R_{adj}^2 0,9020) oraz z modelem Hixona-Corwella (R_{adj}^2 0,9011). Świadczyło to uwalnianiu w mniejszym stopniu zależnym od czasu niż w przypadku włókniny referencyjnej, a także wskazywało, że etapem limitującym szybkość procesu była szybkość rozpuszczania leku, co koreluje z dość niską chłonnością wody materiału. Profil uwalniania SLM dla włókniny PDLGA/Thane/5/H wykazywał dopasowanie do wszystkich wybranych modeli matematycznych z wyjątkiem Higuchiego. Świadczyło to o dużym stopniu skomplikowania procesu, w którym wiele czynników mogło wpływać na kinetykę. Zgodność z modelami Hixona-Corwella oraz Korsmeyera-Peppasa ($n=1,39$) świadczyła o znacznym wpływie erozji na szybkość uwalniania sirolimusu, i pokrywała się z wcześniejszymi obserwacjami, dotyczącymi erozji powierzchniowej.



Rys. 44. Skumulowane uwalnianie sirolimusu z włóknin PDLGA/PCU. Początkowe stężenie leku w nośniku wynosiło 5% (z lewej) i 10% (z prawej). Mikrowłókna matrycy otrzymano z roztworów w HFIP ($\bar{x} \pm \text{SD}$; $N=3$)

Po zwiększeniu początkowego stężenia rapamycyny w matrycy do 10%, we wszystkich przypadkach zaobserwowano uwolnienie większych dawek leku (Rys. 44). W przypadku włókniny odniesienia PDLGA/10/H, przebieg profilu uwalniania ponownie był dwuetapowy. Ilość uwolnionego SLM w czasie 7 dni (pierwszy etap) była jednak niższa, niż dla materiału o dwukrotnie mniejszej zawartości sirolimusu. Było to $9 \pm 1\%$, a w poprzednim przypadku $24 \pm 1\%$. Wynik ten stanowił źródło uzyskania niższych wartości stałych szybkości uwalniania (Tabela 28). Niemniej jednak, taka procentowa ilość odpowiadała niemal tej samej dawce SLM wynoszącej $10,16 \pm 0,56 \mu\text{g}/\text{mg}$. Dopiero po 14 dniach, włóknina zawierająca 2 razy więcej leku uwolniła większą dawkę SLM, przy czym taka tendencja utrzymała się już do końca eksperymentu. Można zatem podejrzewać, że uwolnienie

rapamycyny w początkowej fazie głównie zależało od jej rozpuszczalności w wodzie. Lokalne nasycenie roztworu medium degradacyjnego w przestrzeniach pomiędzy włóknami nośnika spowodowało, że etapem limitującym szybkość procesu była przede wszystkim dyfuzja SLM. Dopasowanie profilu uwalniania do modelu kinetyki pierwszego rzędu, Higuchiego oraz Korsmeyera-Peppasa (wartość współczynnika $n=0,46$) potwierdza to stwierdzenie. Pierwsza z wymienionych zależności matematycznych świadczyła o związku szybkości uwalniania z gradientem stężeń w układzie warstwa statyczna przy powierzchni nośnika – roztwór PBS, ilości leku we włóknach PDLGA oraz czasu. Dwie pozostałe wskazywały na dominację procesów dyfuzyjnych zgodnych z prawami Ficka. Po wyczerpaniu dostępnego przy powierzchni leku, szybkość procesu zwolniła. Niemal liniowy przebieg drugiego etapu uwalniania sugerował, że jego szybkość była zależna głównie od degradacji oraz dyfuzji leku przez matrycę. Od 21 dnia uzyskano średnią tygodniową dawkę SLM wynoszącą $1,52 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{mg}$. Ostatecznie z włókniny PDLGA/10/H uwolniło się $23 \pm 1\%$ rapamycyny, co odpowiadało $25,31 \pm 1,21 \mu\text{g}/\text{mg}$.

Tabela 28. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji R_{adj}^2 przedstawiające dopasowanie modeli kinetyki uwalniania leków do profili uwalniania sirolimusu oraz stałe szybkości uwalniania (k)

Włóknina	Modele kinetyki uwalniania leku				
	0 rzędu	1 rzędu	Higuchiego	Hixona-Corwella	Korsmeyera-Peppasa
	$R_{\text{adj}}^2 (k_0)$	$R_{\text{adj}}^2 (k_1)$	$R_{\text{adj}}^2 (k_H)$	$R_{\text{adj}}^2 (k_{HC})$	$R_{\text{adj}}^2 (n; k_{KP})$
PDLGA/5/H	0,4576 (0,265)	0,9705 (0,286)	0,7239 (3,063)	0,4794 ($113 \cdot 10^{-5}$)	0,9237 (0,26; 12,627)
PDLGA/Sil/5/H	0,9020 (0,024)	0,8721 ($<10^{-3}$)	0,7303 (0,207)	0,9011 ($8 \cdot 10^{-5}$)	0,8744 (1,57; 0,002)
PDLGA/Thane/5/H	0,9775 (0,160)	0,9861 (0,006)	0,9289 (1,486)	0,9801 ($56 \cdot 10^{-5}$)	0,9864 (1,39; 0,049)
PDLGA/10/H	0,8141 (0,245)	0,9661 (0,057)	0,9742 (2,527)	0,8300 ($93 \cdot 10^{-5}$)	0,9895 (0,46; 3,407)
PDLGA/Sil/10/H	0,9667 (0,152)	0,9424 ($<10^{-3}$)	0,8137 (1,338)	0,9633 ($52 \cdot 10^{-5}$)	0,9687 (2,40; 0,001)
PDLGA/Thane/10/H	0,9788 (0,381)	0,9881 (0,007)	0,9381 (3,557)	0,9850 ($143 \cdot 10^{-5}$)	0,9816 (1,33; 0,149)

k_0 – stała szybkości uwalniania zerowego rzędu; k_1 - stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu; k_H - stała szybkości uwalniania Higuchiego; k_{HC} - stała szybkości uwalniania Hixona-Corwella; k_{KP} - stała szybkości uwalniania Korsmeyera-Peppasa; n – współczynnik uwalniania Korsmeyera-Peppasa;

W przypadku obu włókien zawierających nanowłókna PCU, zaobserwowano znaczny wzrost stałych szybkości uwalniania sirolimusu w porównaniu do próbek o 5% stężeniu leku w matrycy (Tabela 28). Ponownie wystąpiła 14-dniowa inhibicja uwalniania SLM z materiału zawierającego nanowłókna ChronoSil. Pomiędzy 14 a 21 dniem uwolniło się średnio $1,37 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{mg}$, natomiast pomiędzy 70 a 84 dniem wartość ta wzrosła do $1,72 \pm 22 \mu\text{g}/\text{mg}$, co sugerowało przyspieszenie uwalniania przy potencjalnym wydłużeniu eksperymentu. Całkowita ilość uwolnionej rapamycyny wyniosła $13 \pm 1\%$, co odpowiadało $13,89 \pm 0,66 \mu\text{g}/\text{mg}$ i stanowiło niemal sześciokrotny wzrost

szybkości uwalniania w stosunku do materiału, w którym początkowa ilość SLM była o połowę mniejsza. Dopasowanie profilu uwalniania sirolimusu do modeli kinetycznych, świadczyło o kinetyce zerowego rzędu (R_{adj}^2 0,9667), charakteryzującej się brakiem zależności szybkości procesu od czasu i stężenia początkowego SLM w matrycy. Czynnikiem limitującym uwalnianie były najprawdopodobniej procesy związane z degradacją i erozją, co sugerowała zgodność uzyskanych wyników z modelami Hixona-Corwella i Korsmeyera-Peppasa ($n=2,40$).

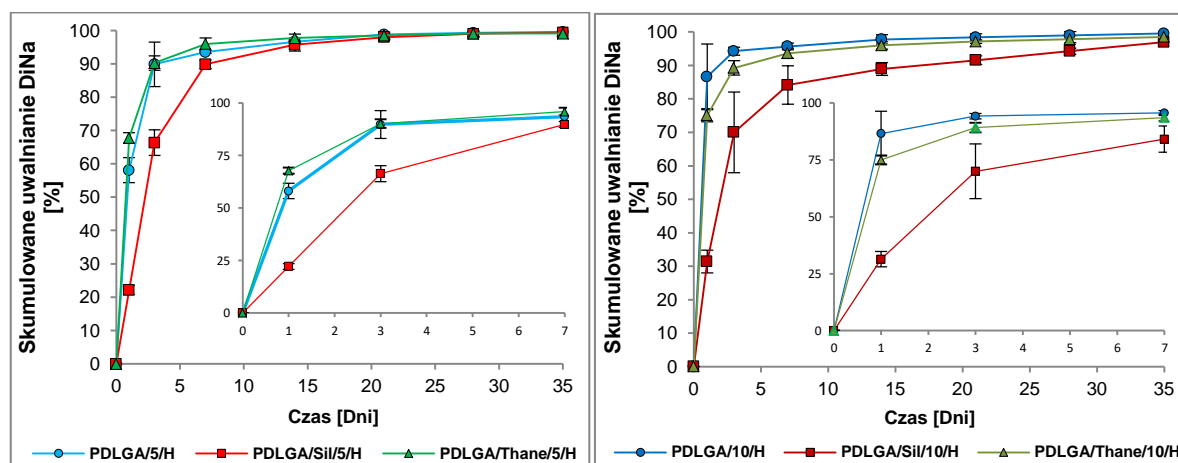
Uwalnianie SLM z włókniny PDLGA/Thane/10/H ponownie miało miejsce od samego początku trwania eksperymentu. Również w tym przypadku zaobserwowano stopniowe uwalnianie sirolimusu od pierwszego dnia eksperymentu. Tym razem uzyskany profil był jednak nieco bardziej skomplikowany. Można było w nim wyróżnić 3 etapy, podczas których rapamycyna uwalniała się z nieco inną szybkością. Największe dawki leku uzyskano pomiędzy 21 a 35 dniem, gdzie średnio w ciągu 7 dni uwalniano $5,38 \pm 0,48$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. We wcześniejszym okresie było to $2,56 \pm 0,86$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ tygodniowo, a w późniejszym, trwającym najdłużej $4,29 \pm 0,88$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. Włóknina ta po zakończeniu etapu najszybszego uwalniania, w 35 dniu inkubacji uwolniła procentowo taką samą ilość leku, jak materiał odniesienia (PDLGA/10/H), natomiast wagowo, próbki zrównały się 42 dnia. Z tego względu materiał PDLGA/Thane/10/H ostatecznie wykazywał najszybsze uwalnianie SLM w czasie 84 dni, spośród materiałów, do których wprowadzono 10% leku. Wynikało to prawdopodobnie z najlepszego pochłaniania wody przez tę włókninę, w połączeniu z brakiem pęcznienia mikrowłókien PDLGA, co skutkowało jedynie nieznacznym zakłóceniem procesów dyfuzji w obrębie objętości włókniny podczas degradacji. Taki trójfazowy profil uwalniania, podobnie jak w przypadku materiału zawierającego 5% stężenie SLM w matrycy, wykazywał wysoki stopień dopasowania do wszystkich rozpatrywanych modeli kinetycznych oprócz Higuchiego. Uwalnianie miało zatem bardzo złożony charakter, w którym prócz procesów dyfuzyjnych kluczową rolę mogła odgrywać erozja (współczynnik Korsmeyera-Peppasa $n=1,33$).

Uzyskane wyniki korelowały ze zmianami hydrofilowości włókien, na skutek wprowadzania coraz bardziej hydrofobowych komponentów w szeregu: PDLGA, HydroThane, ChronoSil. Ze względu na słabą rozpuszczalność rapamycyny w wodzie, duże znaczenie miały opory dyfuzyjne, wynikające z pęcznienia włókien i uszczelniania powierzchni zewnętrznej (głównie przy modyfikacji za pomocą ChronoSil). W przypadku wprowadzenia nanowłókien HydroThane, znaczenie mogło również mieć spowolnienie procesu degradacji hydrolitycznej poprzez zmianę jego mechanizmu na bardziej powierzchniowy. Prawdopodobnie, niezależnie od rodzaju modyfikatora, opłot nanowłókien PCU wokół mikrowłókien PDLGA stanowił również pewną fizyczną przeszkodę dla dyfuzji leków i wody, w szczególności w przypadku bardziej hydrofobowego ChronoSilu. Stąd wynika spowolnienie lub nawet zahamowanie uwalniania w początkowym okresie inkubacji próbek.

15.1.7.2. Wyznaczanie profili uwalniania soli sodowej diklofenaku (DiNa)

Sól sodową diklofenaku uwalniano do wodnego roztworu PBS równocześnie z sirolimusem. Ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie, lek ten bardzo szybko uwalniał się z mikrowłókien PDLGA we wszystkich materiałach, o czym świadczą znacznie wyższe wartości stałych szybkości uwalniania (Tabela 29). W przypadku każdej z włókien zawierającej 5% wag. DiNa w czasie 7 dni

uwolniło się co najmniej 90% wag. jego początkowej ilości (Rys. 45). Wpływ modyfikatorów PCU na przebieg profili uwalniania był w tym przypadku mniejszy, niż dla sirolimusu. Wynikał on ze zmiany makroskopowej hydrofilowości włókniny, gdyż w tak krótkim czasie włókna PDLGA nie zmieniły swoich średnic, a postęp degradacji kopoliestru był niewielki. Mechanizm uwalniania soli sodowej diklofenaku opierał się zatem głównie na rozpuszczaniu i dyfuzji. Zależność szybkości uwalniania DiNa od składu włókniny była szczególnie widoczna na początku inkubacji. Po pierwszym dniu różnice pomiędzy poszczególnymi materiałami były największe. Lek najszybciej uwalniał się z materiału PDLGA/Thane/5/H ($68 \pm 2\%$), ze względu na bardzo dużą ilość zaabsorbowanej w pierwszej dobie wody ($226 \pm 8\%$ wag.), co umożliwiło jego szybkie rozpuszczenie. Nieco wolniej DiNa uwolnił się z włókniny referencyjnej PDLGA/5/H ($58 \pm 4\%$), co wynikało z niższej chłonności, wynoszącej $90 \pm 6\%$, a także niewielkiego skurczu włókien. Modyfikacja za pomocą bardziej hydrofobowego PCU – ChronoSilu, spowodowała znaczne obniżenie szybkości uwalniania leku. Po 24 godzinach było to $22 \pm 1\%$, co było spowodowane największą hydrofobowością i najslabszą zdolnością do absorbowania wody ($67 \pm 5\%$ wag.). Po trzecim dniu, uwzględniając odchylenia standardowe zaobserwowano, że profile uwalniania dla włókniny odniesienia oraz zawierającej nanowłókna HydroThane były już niemal jednakowe. Jedynie dla materiału zawierającego ChronoSil uwalnianie było wolniejsze do 14 dnia, jednak różnica w zmierzonej ilości uwolnionego leku była coraz mniejsza z każdym kolejnym pomiarem. Po 35 dniach nie zarejestrowano obecności leku ani w materiale ani w roztworze PBSu, co świadczyło o całkowitym jego uwolnieniu do otoczenia. Ilość końcowa soli sodowej diklofenaku uwolnionej z włókien PDLGA we wszystkich przypadkach wynosiła ponad 99%.



Rys. 45. Skumulowane uwalnianie soli sodowej diklofenaku z włókien PDLGA/PCU. Początkowe stężenie leku wynosiło 5% (z lewej) i 10% (z prawej), Mikrowłókna matrycy otrzymano z roztworów w HFIP ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Zwiększenie ilości soli sodowej diklofenaku w matrycy do 10% nie wpłynęło na zmianę kształtu profili uwalniania z otrzymanych włókien (Rys. 45). Zaobserwowano jednak wzrost wartości stałych szybkości uwalniania (Tabela 29). Najszybciej uwalniającym materiałem była włóknina odniesienia otrzymana wyłącznie z PDLGA. Lek był niewiele wolniej uwalniany z materiału zawierającego nanowłókna HydroThane, natomiast najwolniejsze uwalnianie ponownie zanotowano w przypadku wprowadzenia nanowłókien ChronoSil. Tym razem różnice w szybkości procesu były jednak nieco

większe. W szczególności były widoczne podczas pierwszych 7 dni inkubacji. Całość wprowadzonego DiNa uwolniła się w czasie 35 dni ze wszystkich materiałów. Przeprowadzając porównanie z włókninami zawierającymi 5% leku stwierdzono, że szybsze uwalnianie zachodziło w tym przypadku jedynie do 3 dnia eksperymentu. W późniejszym etapie różnice były niewielkie, a dla włókniny zawierającej ChronoSil tempo uwalniania leku było nawet niższe niż przy mniejszym stężeniu DiNa w matrycy. Ze względu na to, że podwojono początkową ilość leku, jego końcowe dawki uwolnione w tym eksperymencie były dwa razy większe w tym samym czasie trwania inkubacji próbek.

Niezależnie od stężenia leku we włóknach PDLGA oraz zastosowanego modyfikatora PCU, uzyskane profile uwalniania soli sodowej diklofenaku odpowiadały modelowi kinetyki uwalniania pierwszego rzędu. Wyniki doświadczalne były również zgodne z modelem Korsmeyera-Peppasa. Obliczona wartość współczynnika uwalniania dla wszystkich włóknin przyjmowała wartości $n < 0,50$. Zatem, uwalnianie DiNa było zależne od gradientu stężeń leku pomiędzy warstwą statyczną przy powierzchni włókien nośnika a otaczającym medium, a także od jego ilości w matrycy oraz czasu. Etapem limitującym szybkość procesu była w tym przypadku dyfuzja leku, zgodna z prawami Ficka.

Tabela 29. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji R_{adj}^2 przedstawiające dopasowanie modeli kinetyki uwalniania leków do profili uwalniania soli sodowej diklofenaku oraz stałe szybkości uwalniania (k)

Włóknina	Modele kinetyki uwalniania leku				
	0 rzędu	1 rzędu	Higuchiego	Hixona-Corwella	Korsmeyera-Peppasa
	$R_{adj}^2 (k_0)$	$R_{adj}^2 (k_1)$	$R_{adj}^2 (k_H)$	$R_{adj}^2 (k_{HC})$	$R_{adj}^2 (n; k_{KP})$
PDLGA/5/H	0,2428 (0,952)	0,9937 (0,836)	0,5032 (9,589)	0,5346 (0,023)	0,9560 (0,12; 69,282)
PDLGA/Sil/5/H	0,4044 (1,306)	0,9947 (0,325)	0,6800 (12,401)	0,7693 (0,025)	0,8912 (0,28; 42,985)
PDLGA/Thane/5/H	0,1996 (0,876)	0,9928 (1,070)	0,4485 (8,980)	0,4710 (0,023)	0,9769 (0,09; 75,498)
PDLGA/10/H	0,1189 (0,749)	0,9933 (1,987)	0,3311 (7,886)	0,3284 (0,022)	0,9985 (0,04; 88,485)
PDLGA/Sil/10/H	0,4400 (1,237)	0,9701 (0,356)	0,7085 (11,566)	0,7613 (0,024)	0,9223 (0,23; 47,188)
PDLGA/Thane/10/H	0,1895 (0,843)	0,9817 (1,316)	0,4266 (8,603)	0,4365 (0,022)	0,9928 (0,07; 79,190)

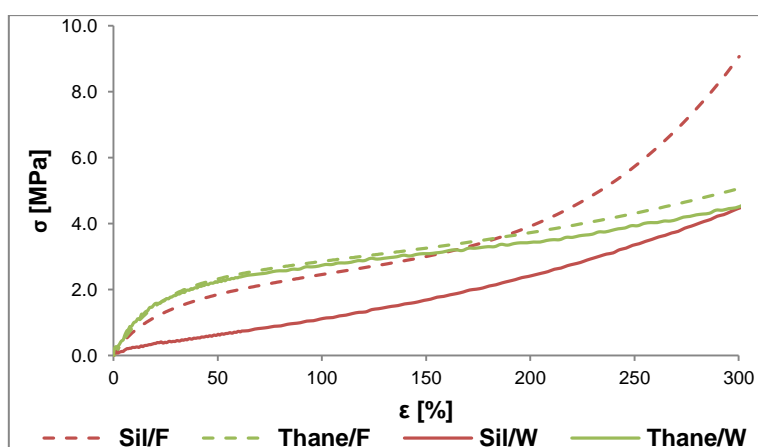
k_0 – stała szybkości uwalniania zerowego rzędu; k_1 - stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu; k_H - stała szybkości uwalniania Higuchiego; k_{HC} - stała szybkości uwalniania Hixona-Corwella; k_{KP} - stała szybkości uwalniania Korsmeyera-Peppasa; n – współczynnik uwalniania Korsmeyera-Peppasa;

Uzyskane wyniki pokazują, że dzięki opisanej metodzie możliwa jest również kontrola przebiegu profili uwalniania łatwo rozpuszczalnych w wodzie leków. Efekt osiągnięto wpływając przede wszystkim na procesy dyfuzyjne w obrębie materiału, od których zależała szybkość uwalniania soli sodowej diklofenaku. Niemniej jednak uzyskana kontrola była w tym przypadku ograniczona, w porównaniu do procesu uwalniania sirolimusu i sprowadzała się jedynie do zmniejszenia szybkości uwalniania leku w pierwszych dniach inkubacji.

15.1.8. Analiza zmian właściwości mechanicznych włókien PDLGA/PCU w czasie inkubacji

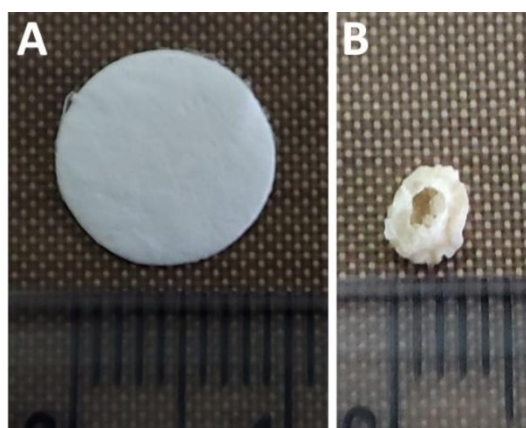
Zmiany właściwości mechanicznych włókien w czasie inkubacji badano w statycznej próbie rozciągania. Na podstawie analizy krzywych zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ), wyznaczono wytrzymałość na rozciąganie σ_{\max} [MPa] oraz wartości naprężenia i odpowiadającego mu odkształcenia na granicy sprężystości (plastyczności) (σ_y [MPa] i ϵ_y [%]). Ze względu na to, że większość tkanek miękkich, wykazuje zdolność do maksymalnego odkształcenia do około 100% (Tabela 2), otrzymane włókniyny, scharakteryzowano dokładniej w tym zakresie, ponieważ ich potencjalnym zastosowaniem, jako siatki chirurgicznej byłoby wzmacnianie tego typu struktur biologicznych.

Jak wcześniej wspomniano, w tych samych warunkach elektroprzędzenia otrzymano mniejsze średnice nanowłókien HydroThane (324 ± 93 nm), niż ChronoSilu (649 ± 87 nm). Prawdopodobnie większa gęstość ładunku elektrycznego na powierzchni roztworu spowodowała silniejsze rozciąganie strumienia HydroThane, oraz większe odpychanie elektrostatyczne jednoimiennych ładunków elektrycznych w stosunku do równocześnie przędzonego roztworu kopoliestru. Wpłynęło to na wewnętrzną strukturę włókniyny, a tym samym na jej właściwości mechaniczne. Obrazuje to porównanie przebiegu krzywych rozciągania próbek PCU w postaci folii oraz elektroprzędzonych włókien (Rys. 46). Jak można zauważyć, dla litej struktury materiału zależność naprężenia od odkształcenia dla obu elastomerów pokrywała się ze sobą do odkształceń wynoszących około 200%. Podczas dalszego rozciągania folia ChronoSil wykazywała tendencję do silniejszej orientacji. Z drugiej strony przebieg krzywych rozciągania dla włókien był zupełnie inny, ze względu na to, że mniejsze średnice nanowłókien HydroThane umożliwiły, przy braku równocześnie elektroprzędzonego, jednoimiennie naładowanego strumienia roztworu PDLGA, spowodowały utworzenie bardziej zwartej struktury niż w przypadku grubszych nanowłókien ChronoSil. Skutkiem było uzyskanie większej wytrzymałości na rozciąganie. Z tego powodu w niniejszym rozdziale skupiono się głównie na zmianach właściwości mechanicznych poszczególnych włókien wynikających z degradacji hydrolytycznej PDLGA oraz uwalniania leków, a nie na porównywaniu poszczególnych próbek w zależności od zastosowanych nanowłókien PCU.

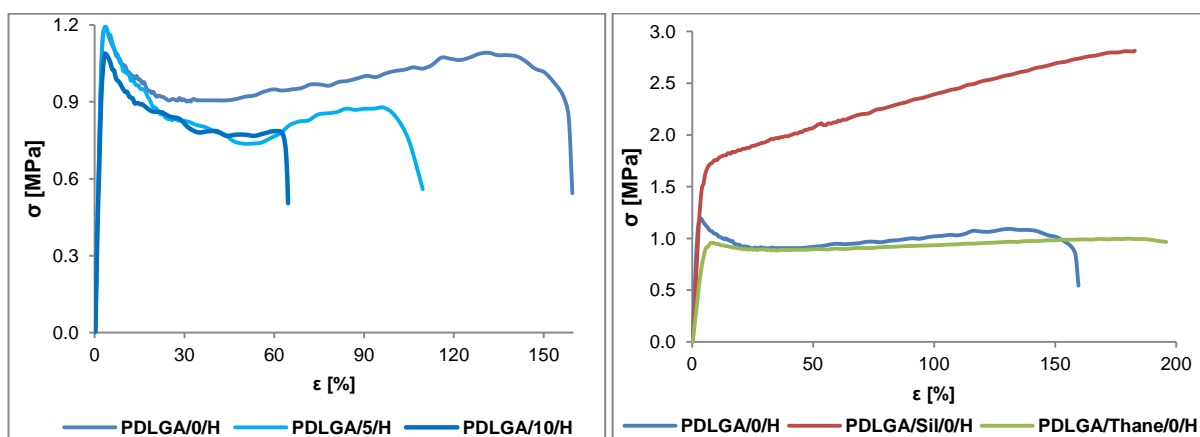


Rys. 46. Przykładowe krzywe zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ), wyznaczone w statycznej próbie rozciągania poliuretanów w postaci prasowanych folii (F) oraz elektroprzędzonych włókien (W)

W przypadku niezmodyfikowanych nanowłóknami PCU włókien PDLGA, zarówno zawierających jak i niezawierających leków, początkowe właściwości mechaniczne były podobne, biorąc pod uwagę wytrzymałość na rozciąganie, parametry na granicy sprężystości oraz naprężenie przy 25%, 50% i 100% odkształcenia. Niemniej jednak, dodatek SLM i DiNa przed degradacją spowodował obniżenie wartości naprężenia w zakresie odkształceń sprężystych, tym większe, im większe było stężenie leków w matrycy PDLGA (Tabela 30). Włókniyny wykazywały jednak wyraźną różnicę, jeśli chodzi o zdolność do maksymalnego odkształcania. Zerwanie następowało tym szybciej, im większą ilość leków wprowadzono do włókien PDLGA (Rys. 48). Podczas eksperymentu zaobserwowano, że po 28 dniach inkubacji w 37 °C wszystkie materiały niezmodyfikowane PCU stały się kruche i wykazywały tendencję do kurczenia się (Rys. 47). W efekcie umieszczenie próbek w uchwytach maszyny wytrzymałościowej było niemożliwe z powodu ich pęknięcia przed rozpoczęciem rozciągania (kruszenie się materiału). Efekt ten nie wynikał z powstawania fazy krystalicznej w czasie degradacji, ponieważ wykorzystano amorficzny poli(D,L-laktyd-co-glikolid). Dlatego włókniyny PDLGA/0/H, PDLGA/5/H oraz PDLGA/10/H zostały potraktowane jedynie jako punkt odniesienia, w celu zbadania wpływu wprowadzenia leków na właściwości mechaniczne przed degradacją hydrolytyczną.

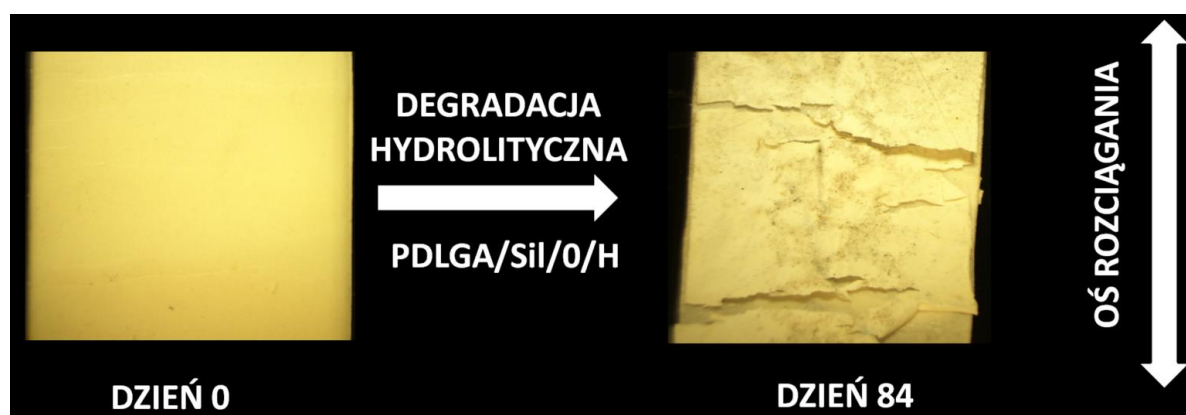


Rys. 47. Rozmiary krążków włókniyny PDLGA/0/H przed degradacją (A) oraz po 84 dniach degradacji (B). Zdjęcia obrazują tendencję do kurczenia się materiału niezmodyfikowanego nanowłóknami PCU



Rys. 48. Przykładowe krzywe rozciągania włókien PDLGA zawierających leki (z lewej) oraz zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien PCU włókien dwukomponentowych, niezawierających substancji aktywnej (z prawej)

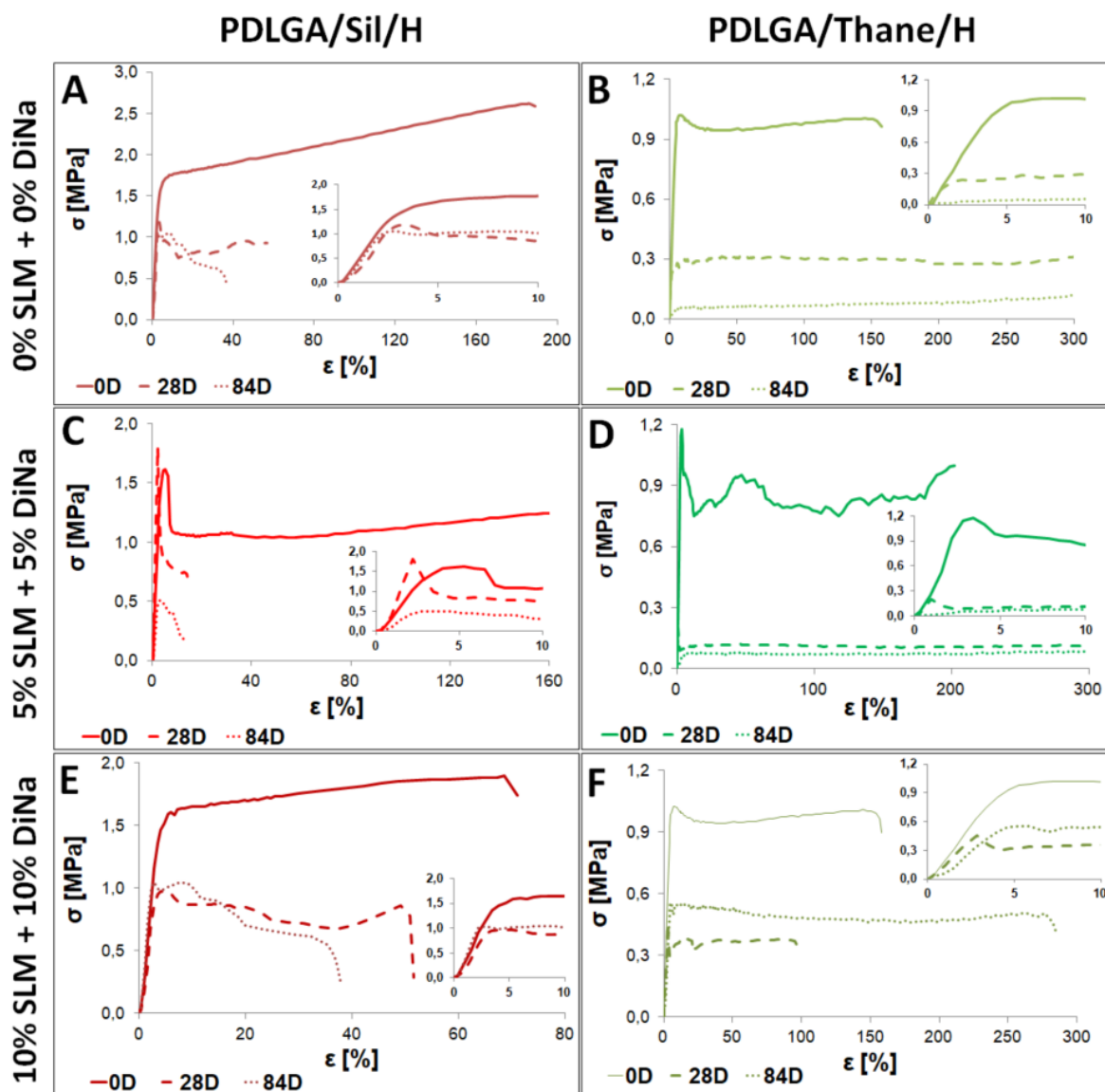
Analizując wpływ nanowłókien PCU na zmianę właściwości mechanicznych przed degradacją w próbkach bez leków, zaobserwowano, że włókniny do których wprowadzono ChronoSil wykazywały największą wartość wytrzymałości na rozciąganie przy bardzo dobrej zdolności do odkształcania. Wynikało to z nieco większych średnic zarówno włókien PDLGA jak i ChronoSil w materiale PDLGA/Sil/0/H, a także bardziej zwartej struktury w porównaniu do PDLGA/Thane/0/H. Stwierdzono również, że wytrzymałość mechaniczna włókien otrzymanych metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia wynikała z superpozycji właściwości obu składników polimerowych: biodegradowalnego oraz nieodegradowalnego. Niezależnie od składu materiału, obserwowano mniej lub bardziej wyraźną granicę sprężystości (plastyczności), która nie występowała w poliuretanowych elastomerach (Rys. 48). Dlatego wnioskowano, że właściwości mechaniczne w zakresie odkształceń sprężystych, spełniających prawo Hooke'a, przed procesem degradacji zależały przede wszystkim od PDLGA. Zatem, mikrowłókna kopoliestrowe miały kluczowe znaczenie w przenoszeniu naprężeń przy małych wartościach odkształceń – od punktu początkowego do granicy sprężystości, która była jednocześnie momentem nieodwracalnego uszkodzenia frakcji włókien biodegradowalnych (pierwszego pęknięcia). Z kolei wykorzystane elastomery PCU wykazywały niskie wartości naprężeń w początkowym okresie rozciągania, które na skutek orientacji włókien stale wzrastały podczas odkształcania. Z tego powodu, dwuskładnikowe włókniny wyjściowe ulegały rozerwaniu przy nieco większych wartościach ϵ , niż wykonane tylko z kopoliestru PDLGA. Przy czym, grubsze włókna ChronoSil pozwalały na silniejsze rozciągnięcie materiału zanim uległ zniszczeniu. Z obserwacji wynikało, że dla odkształceń przekraczających granicę plastyczności, zwiększa się udział w przenoszeniu naprężeń przez włókna poliuretanowe. Było to szczególnie dobrze widoczne w próbkach po degradacji hydrolitycznej, gdzie w wyniku rozciągania uszkodzone zostały warstwy zewnętrzne bogatsze we włókna PDLGA, które na skutek rozkładu straciły właściwości mechaniczne, natomiast rdzeń wewnętrzny składający się głównie z PCU ulegał dalszej deformacji. Zatem, ze względu na zastosowaną strukturę gradientowego przeplotu włókien, dochodziło do pęknięcia zewnętrznych regionów włókniny przy dużych wartościach odkształcenia, jednak próbki nie ulegały całkowitemu zniszczeniu (Rys. 49).



Rys. 49. Obrazy przedstawiające uszkodzenia zewnętrznych warstw włókniny otrzymanej metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia na skutek rozciągania próbki PDLGA/Sil/0/H po 84 dniach inkubacji

Jak pokazano w Rozdziale 14, parametry wytrzymałościowe poliuretanów ChronoSil i HydroThane nie zmieniły się znacząco podczas 84 dni inkubacji w wodnym roztworze PBS w 37°C. Można zatem stwierdzić, że za zmiany właściwości mechanicznych odpowiedzialny był głównie proces degradacji włókien PDLGA. W przypadku obu typów dwukomponentowych włókien bez leków, zaobserwowano spadek wytrzymałości na rozciąganie σ_{max} , który w dla próbek zawierających ChronoSil był mniejszy. Wbrew wcześniejszym oczekiwaniom, elastyczność materiału PDLGA/Sil/0/H uległa redukcji (Rys. 50A). Odmienne zjawisko zaobserwowano jednak w przypadku próbek zawierających HydroThane (Rys. 50B). Pomimo znacznego spadku σ_{max} w całym zakresie odkształceń, szczególnie wyraźnego po 84 dniach, elastyczność materiału wzrosła niemal dwukrotnie. Ponadto największą wartość naprężenia odnotowano przy maksymalnym odkształceniu, co świadczyło o orientacji włókien PCU w próbce. W przypadku obu zmodyfikowanych włókien, po przekroczeniu granicy sprężystości zaobserwowano nagły spadek wartości naprężenia, płynięcie plastyczne pod stałym obciążeniem lub połączenie obu tych zjawisk. Jednak, niezależnie od etapu degradacji, materiał nie pękał od razu, ze względu na obecność nanowłókien PCU, nagromadzonych głównie w rdzeniu włókniny. Zaobserwowano również, że wystąpiła podobna tendencja dla obu analizowanych materiałów – granica plastyczności przesuwała się w kierunku mniejszych odkształceń (po 28 dniach), a następnie w kierunku wartości początkowej (po 84 dniach), jednak jej nie osiągając (Tabela 30). Świadczyło to o tym, że włókniny można było w nieco większym stopniu odkształcić nie powodując żadnych uszkodzeń struktury wewnętrznej. Wartości naprężenia na granicy sprężystości dla PDLGA/Sil/0/H najpierw rosły, a pod koniec eksperymentu znacznie zmalały na skutek degradacji kopoliestru. W przypadku włókniny PDLGA/Thane/0/H nastąpił znaczny spadek odkształcenia na granicy sprężystości (ϵ_y) po 28 dniach, jednak po 84 dniach zanotowano jego wzrost, przy dużym obniżeniu wartości naprężenia (σ_y) w obu punktach czasowych (Tabela 30).

Wprowadzenie 5% stężenia leków w matrycy nie spowodowało zmian wartości naprężenia na granicy sprężystości oraz wytrzymałości na rozciąganie (σ_{yield} i σ_{max}) we włókninie PDLGA/Sil/5/H w ciągu 28 dni, jednak po 84 dniach nastąpił znaczny spadek tych parametrów, wskazujący na postęp degradacji (Tabela 30). Granica sprężystości przesuwała się w kierunku niższych wartości odkształcenia, co wynikało z rozkładu PDLGA. Zdegradowane włókniny wykazywały wytrzymałość na rozciąganie na granicy sprężystości, co świadczyło o tym, że właściwości mechaniczne kopoliestrowych mikrowłókien w dalszym ciągu dominowały w zakresie odkształceń sprężystych (Rys. 50C). Materiały zmodyfikowane nanowłóknami HydroThane ponownie wykazywały odwrotne zachowanie. Podczas degradacji poprawiła się zdolność do odkształcania, jednak nastąpił również znaczny spadek wytrzymałości na rozciąganie (Rys. 50D). Granica plastyczności po 28 dniach zmieniała się podobnie jak w przypadku włókien zmodyfikowanych ChronoSilem, natomiast po 84 dniach już jej nie zaobserwowano, co świadczyło o tym, że za właściwości mechaniczne odpowiadały wyłącznie nanowłókna HydroThane.



Rys. 50. Przykładowe krzywe zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ) obrazujące przebieg zmian właściwości mechanicznych w czasie inkubacji włókien, wyznaczone w statycznej próbie rozciągania

Znaczące różnice w wytrzymałości mechanicznej włókien poddanych degradacji hydrolytycznej, zaobserwowano po zwiększeniu stężenia leków do 10% (Tabela 30). W tym przypadku, próbki w większym stopniu zachowywały swoje początkowe właściwości. W przypadku włókniwy PDLGA/Sil/10/H, po 28 dniach nastąpił większy spadek wytrzymałości na rozciąganie, niż dla włókniwy PDLGA/Sil/5/H, jednak maksymalna zdolność do odkształcenia była wyższa. Po 84 daniach pomimo zrywania materiału przy nieco mniejszych odkształceniach, wytrzymałość na rozciąganie nie uległa zmianie (Rys. 50E). Po wprowadzeniu nanowłókien HydroThane, właściwości mechaniczne również zostały zachowane w znacznie lepszym stopniu (Rys. 50F). Pomimo nieco anomalnego zachowania się w punkcie rozerwania, który po 28 dniach przesunął się w kierunku wyższych odkształceń, a po 84 dniach w kierunku mniejszych, wytrzymałość na rozciąganie początkowo spadła o połowę, co było znacznie lepszym wynikiem niż uzyskany dla PDLGA/Thane/5/H. Później nastąpił wzrost wartości σ_{MAX} , wynikający ze zmniejszenia się objętości przestrzeni pomiędzy włóknami we włókninie.

Tabela 30. Zmiany właściwości mechanicznych włókien zmierzone w czasie inkubacji ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Etap degradacji	Parametr	Oznaczenie włókniwny									
		PDLGA/0/H	PDLGA/5/H	PDLGA/10/H	PDLGA/Sil/0/H	PDLGA/Sil/5/H	PDLGA/Sil/10/H	PDLGA/Thane/0/H	PDLGA/Thane/5/H	PDLGA/Thane/10/H	
Dzień 0	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	0,91±0,10	0,84±0,07	0,84±0,12	1,87±0,05	1,06±0,15	1,73±0,13	0,93±0,05	0,83±0,08	0,96±0,11	
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	0,92±0,08	0,74±0,11	0,77±0,08	2,01±0,08	1,05±0,09	1,86±0,12	0,93±0,04	0,92±0,10	0,95±0,09	
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	1,02±0,14	0,86±0,10	-	2,30±0,13	1,12±0,11	-	0,96±0,04	0,78±0,09	0,98±0,13	
	σ_{max} [MPa] (ϵ_{Cmax} [%])	1,20±0,08 (3,20±0,15)	1,17±0,10 (3,31±0,13)	1,09±0,08 (4,45±0,15)	2,68±0,11 (180,00±2,52)	1,64±0,04 (4,65±0,92)	1,78±0,17 (48,00±28,28)	1,10±0,10 (156,50±16,26)	1,28±0,14 (3,15±0,49)	1,02±0,08 (7,95±3,43)	
	σ_y [MPa] (ϵ_y [%])	1,20±0,08 (3,20±0,15)	1,17±0,10 (3,31±0,13)	1,09±0,08 (4,45±0,15)	1,80±0,09 (9,00±0,85)	1,64±0,04 (4,65±0,92)	1,50±0,16 (5,60±0,57)	1,01±0,04 (7,40±0,81)	1,28±0,14 (3,15±0,49)	0,99±0,25 (4,45±2,19)	
Dzień 28	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	0,69±0,05	zerwanie	0,74±0,08	0,29±0,02	0,11±0,02	0,34±0,07	
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	0,75±0,09	zerwanie	0,79±0,05	0,30±0,01	0,12±0,03	0,37±0,06	
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	zerwanie	zerwanie	zerwanie	0,30±0,02	0,11±0,03	0,34±0,03	
	σ_{max} [MPa] (ϵ_{Cmax} [%])	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	1,28±0,24 (2,28±0,02)	1,67±0,19 (1,85±0,49)	1,08±0,15 (3,75±0,35)	0,31±0,08 (24,41±13,53)	0,22±0,03 (1,25±0,35)	0,45±0,02 (2,90±0,08)	
	σ_y [MPa] (ϵ_y [%])	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	1,28±0,24 (2,28±0,02)	1,67±0,19 (1,85±0,49)	1,08±0,15 (3,75±0,35)	0,28±0,07 (1,50±0,94)	0,22±0,03 (1,25±0,35)	0,45±0,02 (2,90±0,08)	
Dzień 84	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	0,71±0,07	zerwanie	0,66±0,10	0,05±0,01	0,08±0,01	0,54±0,05	
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	zerwanie	zerwanie	zerwanie	0,05±0,01	0,08±0,02	0,53±0,03	
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	zerwanie	zerwanie	zerwanie	0,06±0,02	0,07±0,01	0,48±0,04	
	σ_{max} [MPa] (ϵ_{Cmax} [%])	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	1,22±0,18 (2,57±0,40)	0,41±0,15 (2,45±1,20)	1,10±0,08 (4,15±1,77)	0,11±0,03 (300,11±4,50)*	0,09±0,01 (155,50±147,49)	0,60±0,05 (5,60±0,42)	
	σ_y [MPa] (ϵ_y [%])	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	1,22±0,18 (2,57±0,40)	0,41±0,15 (2,45±1,20)	1,10±0,08 (4,15±1,77)	0,03±0,01 (4,05±0,07)	Nie zaobserwowano	0,60±0,05 (5,60±0,42)	

$\sigma(\epsilon 25\%)/(\epsilon 100\%)$ – naprężenie przy odkształceniu 25%/100%; σ_{max} - wytrzymałość na rozciąganie; ϵ_{Cmax} – odkształcenie odpowiadające maksymalnej wartości naprężenia; σ_y – naprężenie na granicy sprężystości; ϵ_y odkształcenie na granicy sprężystości;

*Brak zerwania próbki w zakresie pomiarowym ograniczonym wymiarami komory środowiskowej. **Próbki zbyt kruche na skutek procesu degradacji – uległy uszkodzeniu podczas montażu w uchwytach maszyny wytrzymałościowej;

Podczas pomiarów zaobserwowano, że zachowanie się materiałów poddanych degradacji hydrolitycznej w czasie statycznej próby rozciągania w dużej mierze zależało od ilości wprowadzonych leków, które zmieniając hydrofilowość włókien PDLGA wpływały na ich degradację oraz erozję. Spowodowało to zmiany w zdolności do maksymalnego odkształcania, wytrzymałości na rozciąganie oraz położeniu granicy sprężystości. Głównym czynnikiem sprzyjającym stabilizacji właściwości mechanicznych było zwiększenie ilości hydrofobowego sirolimusu, który spowolnił hydrolizę PDLGA. Za obniżenie wytrzymałości materiału odpowiedzialna była wzmożona degradacja frakcji mikrowłókien kopoliestru zawierających łatwo rozpuszczalny DiNa. Z obserwacji wynikało jednak, że odgrywało to drugorzędną rolę w ogólnej wytrzymałości na rozciąganie badanych włókien.

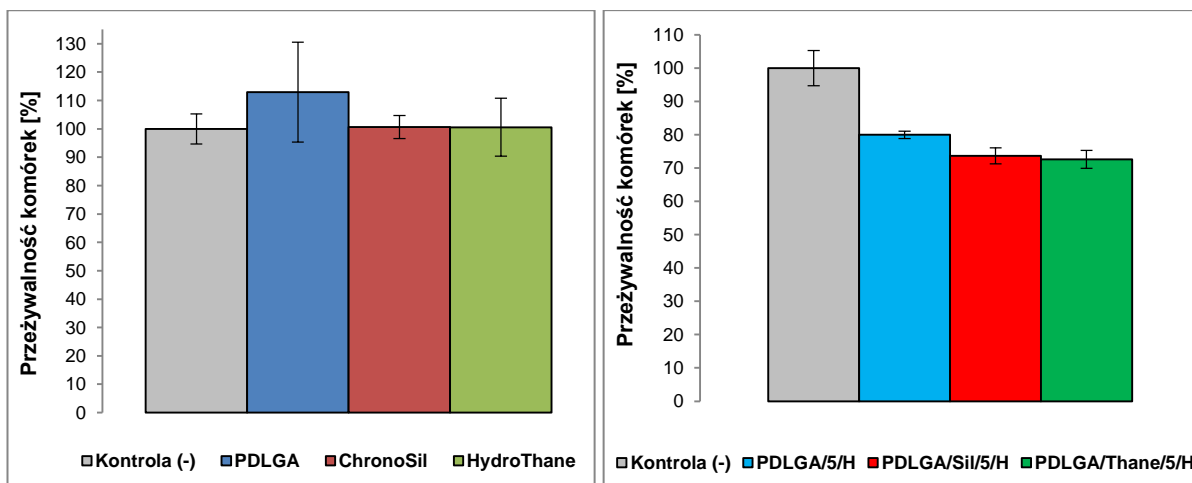
Podsumowując, wprowadzenie frakcji niedegradowanych włókien PCU umożliwiło przeprowadzenie pomiaru właściwości mechanicznych włókien w czasie inkubacji w wodnym roztworze PBS. Niezależnie od obecności leków, zaobserwowano zmniejszenie właściwości mechanicznych wszystkich materiałów ze względu na postęp degradacji hydrolitycznej frakcji mikrowłókien PDLGA. W przypadku materiału zawierającego ChronoSil zauważalnie zmniejszyła się zarówno elastyczność, jak i wytrzymałość na rozciąganie. Z drugiej strony, dodatek modyfikatora HydroThane spowodował znaczny wzrost elastyczności, jednak również wystąpiło bardzo silne obniżenie wytrzymałości mechanicznej materiału, co mogło wynikać zarówno z mniejszych średnic nanowłókien tego PCU, jak również z plastyfikacji polimeru wodą, ze względu na jego higroskopijność i prowadzenie pomiarów bez suszenia próbek, bezpośrednio po pobraniu z medium degradacyjnego.

15.1.9. Badanie włókien PDLGA/PCU z wykorzystaniem linii komórkowej fibroblastów

Przeprowadzone badania na linii komórkowej fibroblastów miały na celu ocenę wpływu leków wprowadzonych do włókien na przeżywalność komórek, a także wyznaczenie zależności ich adhezji od hydrofilowości zastosowanego modyfikatora PCU, morfologii włókien PDLGA oraz rozwinięcia powierzchni właściwej materiału.

15.1.9.1. Cytotoksyczność in vitro

Ocenę cytotoksyczności przeprowadzono na włóknach PDLGA, ChronoSil oraz HydroThane, wytworzonych metodą klasycznego elektroprzędzenia oraz na elektroprzędzonych dwustrumieniowo materiałach składających się z frakcji kopoliestrowych mikrowłókien zawierających po 5% SLM i DiNa oraz nanowłókien modyfikatora PCU (Rys. 51). Zaobserwowano, że przeżywalność komórek w obecności PDLGA była wyższa w porównaniu do kontroli ($113 \pm 17\%$), co było zgodne z wieloma badaniami naukowymi, a także aprobatą FDA odnośnie stosowania kopolimerów laktydu i glikolidu w medycynie i farmacji [264]. Oba komercyjnie dostępne PCU posiadają certyfikat świadczący o spełnianiu standardów USP klasy VI i są określane jako biozgodne. Uzyskały one średni wynik przeżywalności komórek analogiczny do kontroli negatywnej, wynoszący około 100%. Świadczyło to o tym, że zarówno włóknina PDLGA otrzymana z roztworu w HFIP, jak i włókniny poliuretanowe wytworzone z roztworów w DMAc, nie wykazywały działania cytotoksycznego w okresie 3 dni prowadzenia obserwacji.

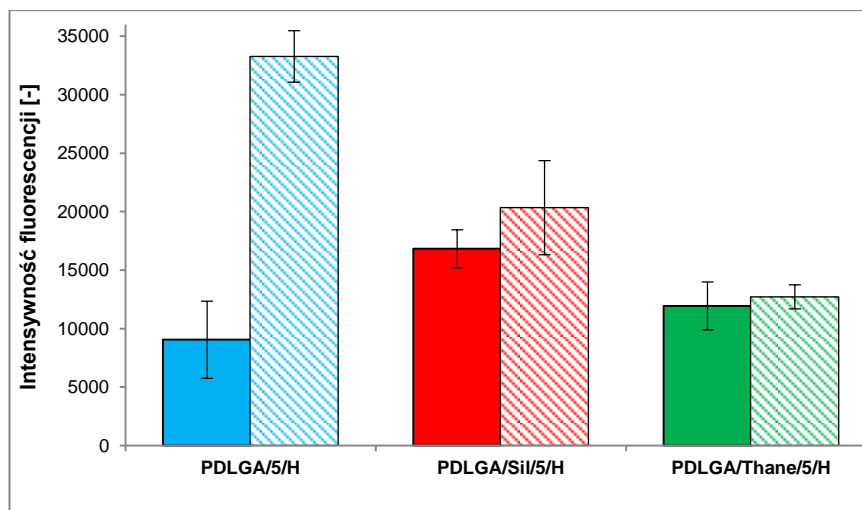


Rys. 51. Przeżywalność komórek wyznaczona w materiałach wyjściowych (z lewej) oraz we włókninach zawierających po 5% SLM oraz DiNa (z prawej) ($\bar{x} \pm SD$; N=4)

Badaniu poddano także włókniny otrzymane metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia. Wprowadzenie substancji aktywnych spowodowało obniżenie przeżywalności komórek, co ze względu na obecność sirolimusu było zgodne z przewidywaniami. Zaobserwowano nieco mniejszą cytotoksyczność próbki niezmodyfikowanej nanowłóknami PCU, niż w przypadku materiałów dwukomponentowych. Dla PDLGA/5/H przeżywalność komórek wynosiła $80 \pm 1\%$, zaś po wprowadzeniu ChronoSilu oraz HydroThane było to odpowiednio $74 \pm 3\%$ i $73 \pm 4\%$. Przyczyna wyższej cytotoksyczności materiałów zawierających PCU, pomimo mniejszej ilości uwolnionego sirolimusu (Rys. 44) w czasie 3 dni nie została ustalona. Zarejestrowano jedynie wpływ działania SLM, lecz efekt jego dawki nie został zaobserwowany, stanowi przedmiot dalszych badań. Wpływ soli sodowej diklofenaku był w tym przypadku pomijalny, ponieważ, jak podaje Sowmya *et al.*, DiNa nie wykazuje działania cytotoksycznego w stosunku do fibroblastów poniżej stężenia 318 mg/ml [265]. Wprowadzona ilość tego leku do nośnika PDLGA była wielokrotnie mniejsza (Tabela 27), co nawet przy natychmiastowym uwolnieniu całości leku nie pozwoliłoby na osiągnięcie tego stężenia.

15.1.9.2. Adhezja fibroblastów

Adhezja komórek na powierzchni otrzymanych włókien zależała od ich powierzchni właściwej i porowatości [266]. W badanym przypadku przekładało się na średnice włókien oraz objętość wolnych przestrzeni pomiędzy nimi. W przeprowadzonym eksperymencie porównano adhezję fibroblastów na powierzchni z obu stron materiału. Na pierwszej z nich, mikrowłókna PDLGA zawierały 5% wag. sirolimusu, a na drugiej analogiczną ilość soli sodowej diklofenaku. Obie powierzchnie różniły się również morfologią (Rys. 32 i Rys. 33). Strona znajdująca się w bezpośrednim kontakcie z kolektorem włókien (zawierająca rapamycynę) posiadała nieco bardziej zwartą strukturę, ponieważ była dociskana przez kolejno nakładane podczas elektroprzędzenia warstwy, natomiast strona zawierająca sól sodową diklofenaku miała luźniejszą formę, o większych przestrzeniach między włóknami. Na każdej z badanych powierzchni średnice PDLGA posiadały nieco inne wartości (Tabela 23).



Rys. 52. Adhezja fibroblastów na powierzchni włóknin zawierających sirolimus (pola pełne) oraz sól sodową diklofenaku (pola kreskowane) ($\bar{x} \pm SD$; N=4)

W każdym ze zbadanych przypadków zaobserwowano mniejszą zdolność do adhezji komórek na powierzchni włókniny zawierającej mikrowłókna PDLGA, do których wprowadzono SLM. Największa różnica miała miejsce w materiale niezmodyfikowanym za pomocą nanowłókien PCU. Intensywność fluorescencji (IF), będąca wskaźnikiem ilości fibroblastów wynosiła w tym przypadku 9059 ± 993 dla strony zawierającej SLM oraz 33264 ± 5192 dla strony uwalniającej DiNa. Uzyskane wyniki pokazały, że zdolność do adhezji komórek na powierzchni zawierającej rapamycynę była wypadkową szybkości uwalniania tego leku (Rys. 44) oraz morfologii i hydrofilowości powierzchni. W przypadku włókniny zawierającej ChronoSil była ona najmniejsza, przy IF wynoszącej 16822 ± 809 , zaś próbka, do której wprowadzono nanowłókna HydroThane wykazywała niższą zdolność komórek do adhezji (IF 11942 ± 1086). W przypadku powierzchni materiałów, które zawierały mikrowłókna PDLGA uwalniające DiNa, wzrost adhezji był spowodowany brakiem czynnika cytotoksycznego oraz mniej zwartą strukturą włókniny, w szczególności w materiale PDLGA/5/H, niezawierającym nanowłókien modyfikatora. W materiałach do których wprowadzono nanowłókna PCU, zaobserwowano jednak, że IF malała wraz ze wzrostem ich hydrofilowości. Przyczyna uzyskania takiego rezultatu mogła wynikać z różnic w objętości pustych przestrzeni pomiędzy włóknami. Nanowłókna HydroThane mając około dwukrotnie mniejsze średnice tworzyły gęstszą sieć, co mogło utrudniać adhezję fibroblastów.

Podsumowując, badania *in vitro* na komórkach pokazały, że możliwe jest zmodyfikowanie adhezji fibroblastów na powierzchni włóknin. Uzyskane rezultaty były wynikiem nakładania się kilku efektów, wynikających zarówno z morfologii powierzchni, hydrofilowości jej komponentów, a także obecności leków. Ze względu na dość niewielką szybkość uwalniania substancji aktywnych (oprócz materiału niezmodyfikowanego), można podejrzewać, że uzyskane wyniki zależały w większym stopniu od morfologii powierzchni oraz jej hydrofilowości.

15.2. *Eksperyment 2 – badanie włókien PDLGA otrzymanych z roztworów w DCM, zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien ChronoSil, HydroThane oraz ChronoFlex*

Ze względu na powolne uwalnianie sirolimusu z mikrowłókien PDLGA otrzymanych z roztworów w HFIP, przeprowadzono drugi eksperyment, mający na celu ocenę dwóch sposobów zmiany kinetyki tego procesu, stanowiących narzędzie pozwalające na lepsze dostosowanie profilu uwalniania do potrzeb. Pierwsza z wykorzystanych metod polegała na zastosowaniu bardziej lotnego rozpuszczalnika podczas elektroprzędzenia roztworu kopoliestru, takiego jak dichlorometan (DCM). Miało to na celu zwiększenie porowatości i rozwinięcie powierzchni mikrowłókien. Drugi sposób opierał się na założeniu, że wprowadzenie modyfikatora w formie nanowłókien PCU o większej hydrofilowości (mniejszym kącie zwilżania) od PDLGA zwiększy powinowactwo włókniny do wody i przyspieszy szybkość uwalniania leków. W tym celu, do badań wprowadzono najbardziej hydrofilowy spośród wybranych poliuretanów - ChronoFlex. Dzięki jego właściwościom mechanicznym spodziewano się również poprawy wytrzymałości włókien. W *Eksperymencie 2* zdecydowano się na jedno stężenie leku w matrycy, wynoszące 5%, wychodząc z założenia, że lepszym rozwiązaniem jest zwiększanie efektywności uwalniania, niż ilości substancji aktywnej w systemie. Oprócz tego, zbadano również wpływ dokonanych modyfikacji na szybkość degradacji hydrolytycznej PDLGA, właściwości mechaniczne, przenikanie modelowej substancji małowcząsteczkowej przez wewnętrzną strukturę włókien oraz przeprowadzono badania biologiczne z wykorzystaniem linii komórkowej fibroblastów.

15.2.1. *Analiza zmian morfologii powierzchni włókien*

Metodą skaningowej mikroskopii elektronowej SEM analizowano wpływ zastosowania rozpuszczalnika o większej lotności podczas elektroprzędzenia, na zmiany w morfologii włókien PDLGA oraz całej powierzchni otrzymanych włókien, zachodzące w czasie degradacji hydrolytycznej. Metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia uzyskano przeplot mikrowłókien kopoliestrowych i nanowłókien PCU. Nanowłókna poliuretanowe nie wykazywały większych zamin średnic w czasie inkubacji, dlatego wartości średnie wyciągnięto dla całego okresu prowadzenia obserwacji, wynoszącego 168 dni. W przypadku ChronoSilu było to 524 ± 85 nm, HydroThane 383 ± 99 nm a dla ChronoFlexu 599 ± 178 nm. Jak można zaobserwować, uzyskane rezultaty były porównywalne z otrzymanymi w *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.1).

Wykorzystanie dichlorometanu (DCM) w roztworach PDLGA spowodowało wzrost średniej wartości średnic mikrowłókien PDLGA (Tabela 31), w stosunku do materiałów elektroprzędzonych z roztworów w heksafluoroizopropanolu (HFIP) (Tabela 22). Rozmiary biodegradowalnych mikrowłókien bez leków były większe o 87% w przypadku włókniny odniesienia, o 18% w materiale zmodyfikowanym za pomocą nanowłókien ChronoSil oraz o 44% w przypadku próbek zawierających HydroThane. Wartości uzyskanych średnic w zależności od materiału wahały się od około 2 μ m do ponad 6 μ m. Duże odchylenia standardowe świadczyły o większej niestabilności elektroprzędzenia oraz o gorszej powtarzalności procesu. Uzyskane rezultaty można było wytłumaczyć różnymi właściwościami fizycznymi rozpuszczalników DCM i HFIP, które wykorzystano do sporządzenia roztworów. Ich podstawowe parametry podano w Tabeli 32. Dichlorometan jest cieczą bardziej lotną,

o niższej temperaturze wrzenia i niemal dwukrotnie wyższej prężności pary nasyconej niż heksafluoroizopropanol, co spowodowało jego szybsze odparowanie. Skutkowało to zarówno wzrostem lepkości kropli roztworu znajdującej się na końcu dyszy przędzalniczej (zmiana stężenia roztworu poprzez odparowanie rozpuszczalnika), jak i wcześniejszym zestaleniem się elektroprzędzonego strumienia we włókno, przez co rozciągające siły pola elektrycznego przez krótszy czas skutecznie oddziaływały na przetwarzany roztwór. Większe napięcie powierzchniowe DCM dodatkowo utrudniało przędzenie, a mniejsza wartość elektrycznego momentu dipolowego powodowała, że roztwór słabiej oddziaływał z polem elektrycznym. Należy również wziąć pod uwagę, różnice w interakcji rozpuszczalników z rozpuszczonym w nich polimerem. Efekty te, pomimo mniejszej lepkości i gęstości DCM spowodowały, że przy takich samych parametrach procesu elektroprzędzenia uzyskano wspomniany wzrost średniej wartości średnic włókien oraz odchylen standardowych. Innym skutkiem zastosowania bardziej lotnego rozpuszczalnika było wytworzenie na etapie elektroprzędzenia znacznej porowatości włókien, co było celem w *Eksperymencie 2*. Szybkie odparowanie DCM sprawiło, że zadziałał on w roli czynnika generującego pory, który w znacznym stopniu zwiększył powierzchnię właściwą włókien PDLGA (Rys. 53).

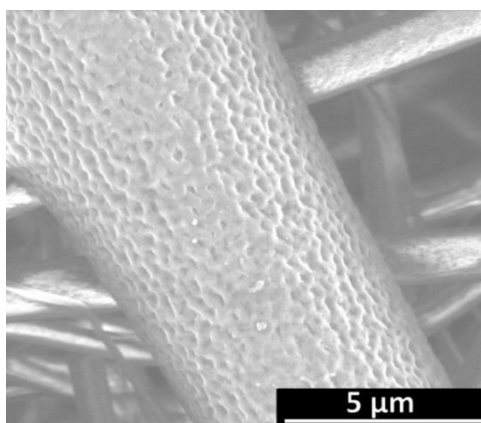
Tabela 31. Średnice mikrowłókien PDLGA bez leków, zmierzone podczas inkubacji ($\bar{x} \pm SD$; N=50)

Skład włókniny	Dzień 0	Dzień 84	Dzień 168
	ϕ_0 [μm]	ϕ [μm]	ϕ [μm]
PDLGA/0/D	4,07 \pm 2,06	5,44 \pm 1,48	5,12 \pm 1,24
PDLGA/Sil/0/D	3,11 \pm 1,01	5,98 \pm 3,47	Brak struktury włóknistej PDLGA
PDLGA/Thane/0/D	3,21 \pm 0,66	3,36 \pm 0,92	Brak struktury włóknistej PDLGA
PDLGA/Flex/0/D	3,80 \pm 1,10	4,70 \pm 0,91	Brak struktury włóknistej PDLGA

Niezmodyfikowana włóknina odniesienia posiadała największe średnice mikrowłókien kopoliestru oraz najszerszy rozrzut ich wielkości (4,07 \pm 2,06 μm). W czasie 84 dni degradacji hydrolytycznej, zaobserwowano spęcznienie, skutkujące wzrostem ich wartości o około 34% (Rys. 54B). Nastąpił również skurcz i zapadnięcie się struktury, w wyniku czego objętość wolnych przestrzeni pomiędzy włóknami uległa zmniejszeniu. Na skutek procesów erozyjnych rozmiary porów uległy powiększeniu, co spowodowało rozwinięcie powierzchni właściwej. Po 168 dniach zaobserwowano, że część włókien, w szczególności tych o większych rozmiarach, uległa rozkładowi tworząc litą warstwę polimeru. Jednak, w dalszym ciągu możliwe było wyszczególnienie pewnej frakcji o średnicach 5,12 \pm 1,24 μm . Pojawiła się również silna erozja, która spowodowała znaczny wzrost porowatości. Wytworzyły się także puste w środku struktury świadczące o dominacji procesów związanych z degradacją mikrowłókien w masie (Rys. 54C). Co ciekawe, włóknina referencyjna nie uległa kompletnej dezintegracji, jak w przypadku swojego odpowiednika otrzymanego z roztworów w HFIP, co mogło świadczyć o nieco wolniejszym przebiegu degradacji.

Tabela 32. Porównanie wpływających na proces elektroprzędzenia właściwości fizycznych dichlorometanu (DCM) oraz hexafluoroizopropanolu (HFIP), na podstawie danych uzyskanych z bazy PubChem

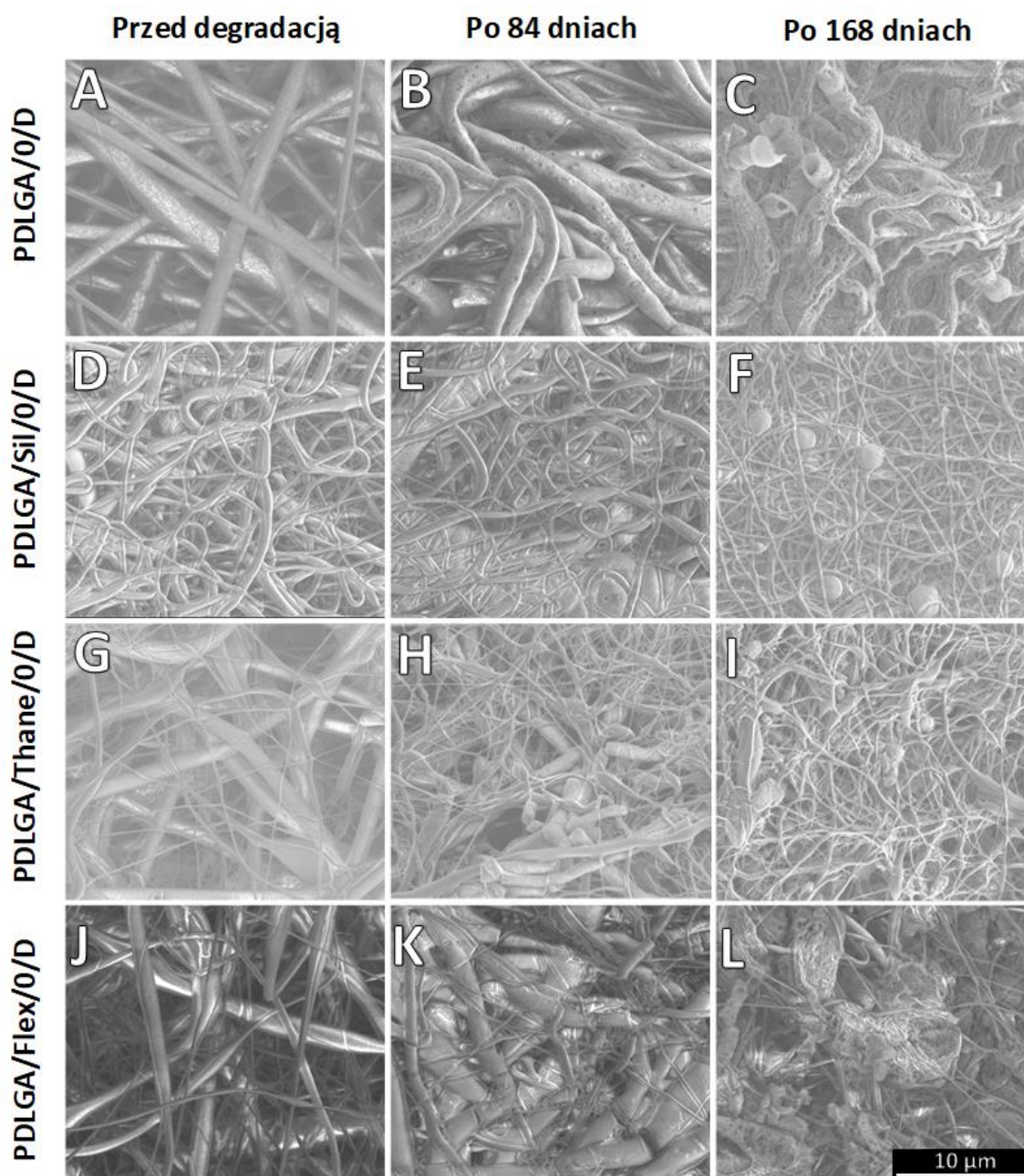
Właściwości fizyczne	HFIP	DCM
Temperatura wrzenia [°C] (1 atm)	59	40
Prężność pary nasyconej [kPa] (20 °C)	206	474
Gęstość [g/cm ³]	1,66	1,33
Lepkość [cP]	1,65	0,42
Napięcie powierzchniowe [mN·m ⁻¹]	16,1	28,1
Elektryczny moment dipolowy [D]	2,05	1,6



Rys. 53. Obraz SEM (x10 000) pokazujący porowatość powierzchni włókna PDLGA otrzymanego w procesie elektroprzędzenia z roztworu w DCM

Wprowadzenie PCU, ze względu na wzajemne oddziaływanie równocześnie elektroprzędzonych strumieni roztworów polimerów, podobnie jak w *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.1) spowodowało uzyskanie nieco mniejszych średnic włókien PDLGA (Tabela 31). W przypadku modyfikacji za pomocą nanowłókien ChronoSilu, rozmiary mikrowłókien kopoliestrowych wynosiły $3,11 \pm 1,01 \mu\text{m}$, co było wartością o 24% mniejszą od uzyskanej dla materiału odniesienia. W czasie degradacji hydrolytycznej nastąpił silny wzrost wielkości średnic, wynoszący 92% po 84 dniach (Rys. 54E), a największe włókna PDLGA zaczęły się łączyć w jednolitą masę. Nastąpił także wzrost porowatości ich powierzchni. Po 168 dniach, na skutek procesów degradacji i erozji frakcja biodegradowalna niemal zniknęła z powierzchni włókniny, pozostawiając jedynie sieć nanowłókien ChronoSil (Rys. 54F). Założono jednak, że w wewnętrznych warstwach materiału w dalszym ciągu obecny był kopoliester, co potwierdziły inne badania.

W przypadku materiału zawierającego nanowłókna HydroThane, wielkość mikrowłókien PDLGA ($3,21 \pm 0,66 \mu\text{m}$) była porównywalna z uzyskanymi dla włókniny zawierającej ChronoSil. Podobnie jak w przypadku analogicznego materiału otrzymanego w *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.1), w czasie 84 dni degradacji nie zaobserwowano pęcznienia włókien, natomiast część z nich uległa pęknięciu (Rys. 54H). Nastąpił również niewielki wzrost ich porowatości. Po 168 dniach na powierzchni włókniny zostały tylko niewielkie pozostałości PDLGA, zawieszane w sieci nanowłókien (Rys. 54I). Prawdopodobnie, również w tym przypadku część frakcji kopoliestru została zamknięta wewnątrz gradientowej struktury włókniny.



Rys. 54. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włóknin PDLGA/PCU niezawierających leków

Modyfikacja włókniny za pomocą najbardziej hydrofilowego poliuretanu ChronoFlex tylko w niewielkim stopniu wpłynęła na początkową wielkość średnic mikrowłókien PDLGA, co mogło świadczyć o stosunkowo małej liczbie nośników ładunku w roztworze PCU podczas elektroprowadzenia. Stwierdzenie to potwierdzało uzyskanie większych wymiarów nanowłókien ChronoFlex, przy powadzeniu procesu w takich samych warunkach jak dla innych poliuretanów (599 ± 178 nm). Po 84 dniach na skutek spęcznienia nastąpił wzrost rozmiarów mikrowłókien PDLGA o około 24%. Wystąpił jednak skurcz i zapadnięcie się struktury powodujące uszczelnienie powierzchni materiału. Zmiany w porowatości były jednak niewielkie, nie zaobserwowano również wyraźnych śladów erozji (Rys. 54K). Po 168 dniach nastąpiła utrata struktury włóknistej frakcji

kopoliestrowej. Pozostałości PDLGA, które nie uległy degradacji hydrolitycznej pozostały zawieszony w sieci nanowłókien ChronoFlex (Rys. 54L).

Wprowadzenie leków do matrycy PDLGA zauważalnie wpłynęło na zmiany w morfologii włókien podczas degradacji hydrolitycznej. Tak jak w *Eksperymentcie 1*, obecność substancji aktywnych w elektroprzędzonym roztworze spowodowała otrzymanie włókien o mniejszych rozmiarach (Tabela 33). Ponownie, uzyskany efekt był silniejszy w przypadku dodatku jonowej soli diklofenaku. Włókna PDLGA, do których wprowadzono DiNa, charakteryzowały się mniejszymi średnicami wyjściowymi, a w trakcie degradacji hydrolitycznej większym spęcznieniem i postępem erozji niż w wariacie zawierającym trudno rozpuszczalny SLM (Tabela 33). W materiale PDLGA/5/D, w czasie 84 dni nastąpił 124% wzrost średniej wartości średnic, a także znaczne zwiększenie porowatości wynikające z uwolnienia leku oraz erozji. Włóknina uległa w pewnym stopniu zapadnięciu, jednak nie nastąpiło całkowite uszczelnienie jej powierzchni zewnętrznej (Rys. 55B). Wszystkie włókna zachowały swój kształt (brak łączenia się włókien), jednak część z nich uległa pęknięciu. Po 168 dniach na skutek degradacji, na powierzchni włókien powstały liczne otwory, prowadzące do pustego rdzenia, co świadczyło o przewadze mechanizmu erozji homogenicznej (Rys. 55C). Średnice zewnętrzne wynosiły $6.46 \pm 1,11 \mu\text{m}$, co stanowiło wzrost o 257% w stosunku do wyjściowych wartości.

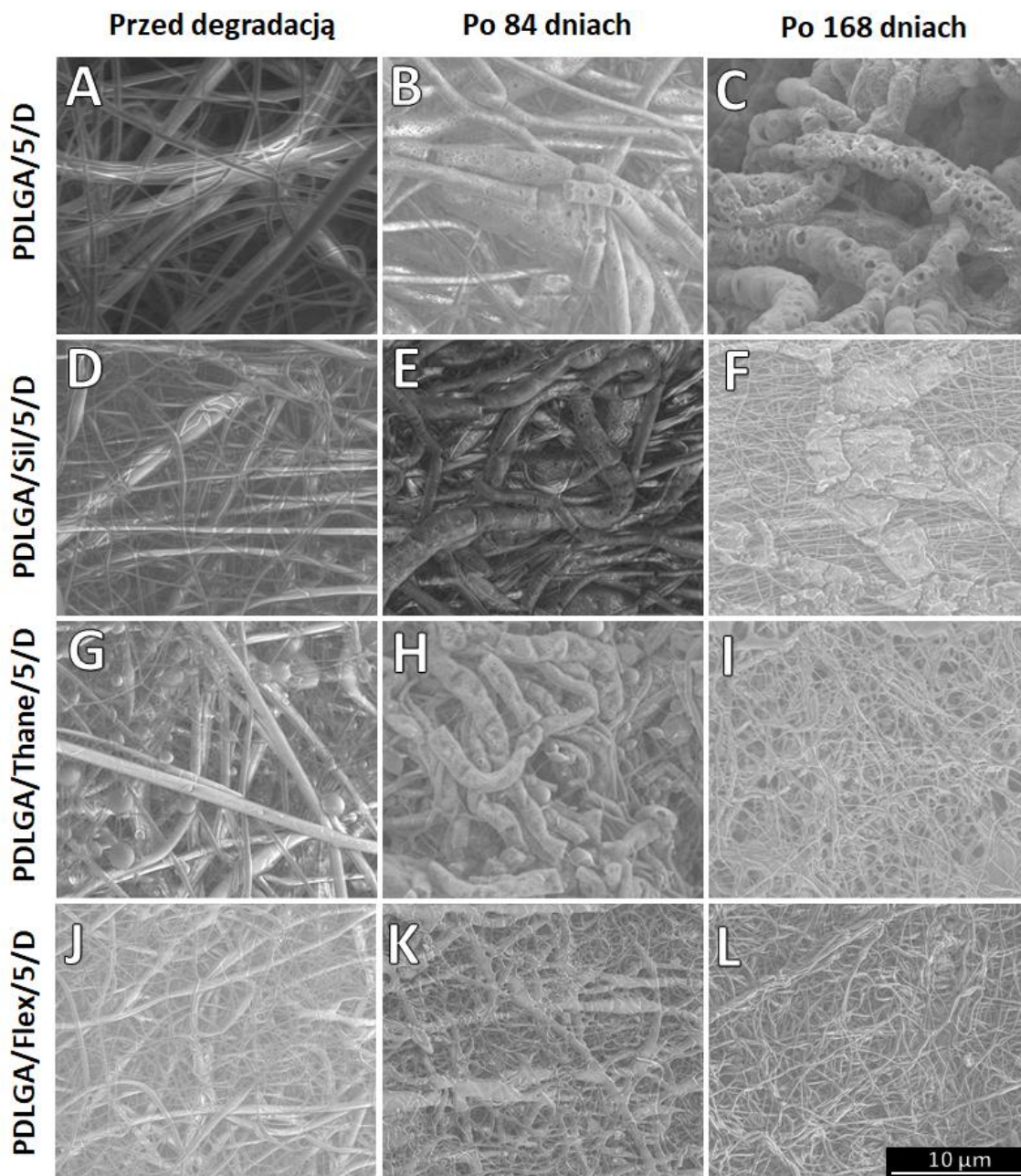
Tabela 33. Średnice mikrowłókien PDLGA (5% SLM i DiNa), zmierzone podczas inkubacji ($\bar{x} \pm \text{SD}$; N=50)

Skład włókniny	Dzień 0	Dzień 84	Dzień 168
	ϕ_0 [μm]	ϕ [μm]	ϕ [μm]
PDLGA/5/D (SLM)	$2,46 \pm 0,92$	$4,31 \pm 2,60$	Brak struktury włóknistej PDLGA
PDLGA/5/D (DiNa)	$1,81 \pm 1,56$	$4,06 \pm 2,23$	$6.46 \pm 1,11$
PDLGA/Sil/5/D (SLM)	$2,69 \pm 1,00$	$4,05 \pm 1,85$	Brak struktury włóknistej PDLGA
PDLGA/Sil/5/D (DiNa)	$2,26 \pm 1,17$	$3,54 \pm 2,01$	Brak struktury włóknistej PDLGA
PDLGA/Thane/5/D (SLM)	$2,74 \pm 1,79$	$3,26 \pm 1,81$	Brak struktury włóknistej PDLGA
PDLGA/Thane/5/D (DiNa)	$2,31 \pm 0,90$	$3,30 \pm 1,36$	Brak struktury włóknistej PDLGA
PDLGA/Flex/5/D (SLM)	$2,87 \pm 1,05$	$3,62 \pm 2,01$	Brak struktury włóknistej PDLGA
PDLGA/Flex/5/D (DiNa)	$2,17 \pm 0,468$	$3,84 \pm 0,97$	Brak struktury włóknistej PDLGA

W czasie inkubacji włókniny PDLGA/Sil/5/D, w porównaniu do materiału odniesienia obserwowano nieco mniejsze zmiany w morfologii powierzchni. Po 84 dniach rozmiary mikrowłókien PDLGA wzrosły o 57%. Ich porowatość zwiększyła się ze względu na uwolnienie DiNa, a na powierzchni pojawiły się większe kanały. Niektóre włókna częściowo połączyły się ze sobą, zaś pewna część uległa pęknięciu. Objętość wolnych przestrzeni pomiędzy nimi drastycznie zmalała, co spowodowało uszczelnienie powierzchni zewnętrznej włókniny (Rys. 55E). Po 168 dniach zaobserwowano postęp degradacji hydrolitycznej. Włókna PDLGA całkowicie utraciły swoją strukturę i połączyły się ze sobą, stanowiąc wtrącenia w gęstej sieci nanowłókien ChronoSil (Rys. 55F). Ilość biodegradowalnej frakcji polimeru, obserwowana na powierzchni włókniny była niewielka.

Mikrowłókna PDLGA zmodyfikowane za pomocą nanowłókien HydroThane po 84 dniach degradacji wykazywały bardzo dużą porowatość oraz tendencję do pęknięcia (Rys. 55H). Nie zaobserwowano uszczelnienia powierzchni włókniny, chociaż nastąpiło pewne zmniejszenie objętości

wolnych przestrzeni. Wymiary średnic włókien PDLGA wzrosły o 43%, co było najmniejszym wynikiem w porównaniu z innymi materiałami. Po 168 dniach na skutek degradacji i erozji niemal nie obserwowano frakcji kopoliestru przy powierzchni. Śladowe ilości były obecne pomiędzy nanowłóknami HydroThane (Rys. 55l).

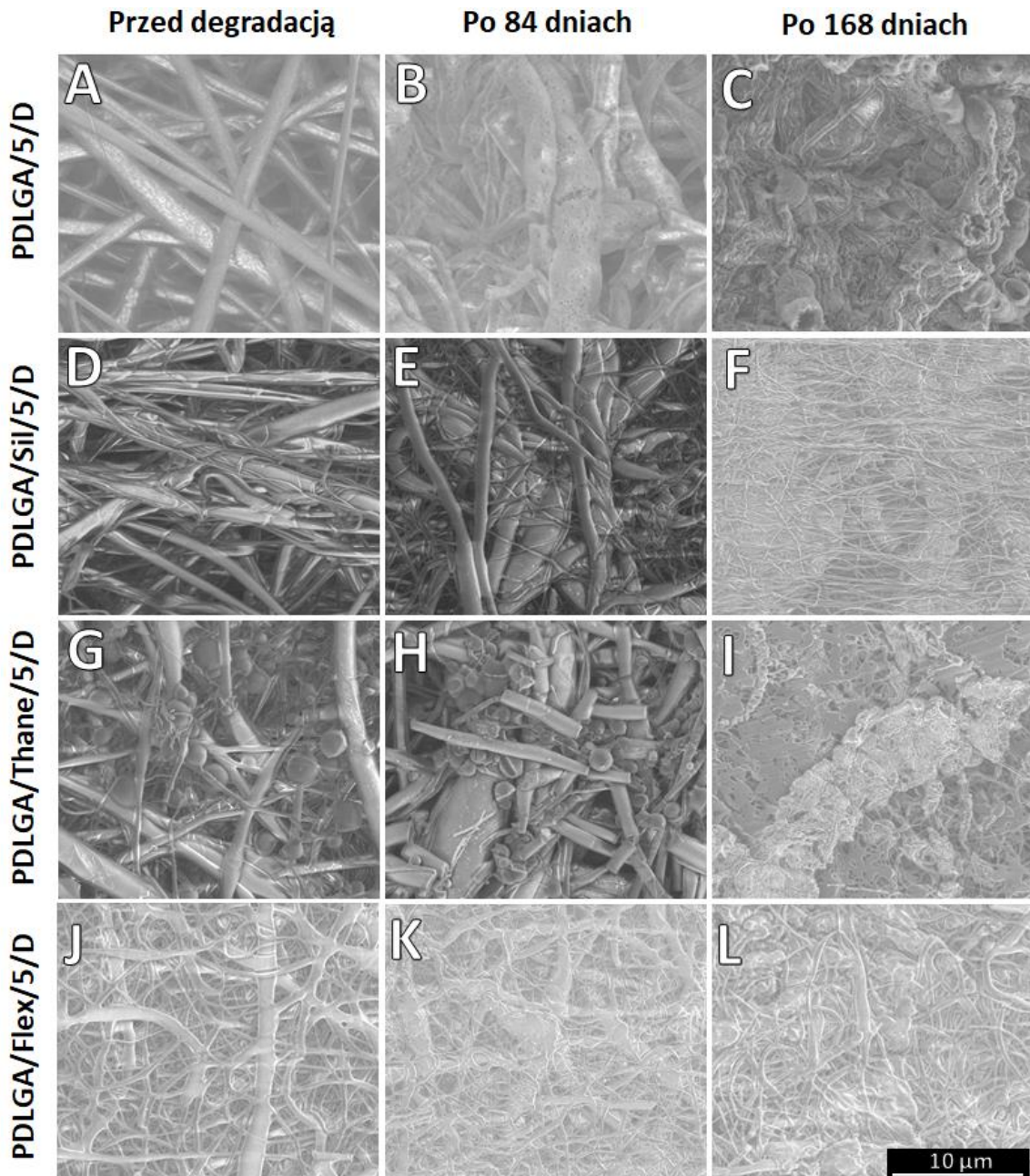


Rys. 55. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 5% DiNa

W przypadku włókniny PDLGA/Flex/5/D obserwacje były analogiczne. Po 84 dniach nastąpiło spęcznienie włókien PDLGA wynoszące 77%, chociaż zmiany rozwinięcia ich powierzchni (porowatość) były niezauważalne. Ze względu na dużą sztywność ChronoFlexu, skurcz i zapadnięcie się struktury nie były znaczące (Rys. 55K). Po 168 dniach podobnie jak w wariantcie modyfikacji za

pomocą HydroThane, obserwowano jedynie śladowe ilości kopoliestru pomiędzy nanowłóknami PCU (Rys. 55L).

W przypadku włókien PDLGA zawierających 5% trudno rozpuszczalnego sirolimusu, zmiany w morfologii powierzchni były ograniczone w podobny sposób jak w *Eksperymencie 1*. Jednak, za sprawą zwiększenia porowatości, na skutek wykorzystania roztworów w DCM podczas elektroprzędzenia, hydrofobizacja wynikająca z wprowadzenia do matrycy leku dała prawdopodobnie słabszy efekt, ze względu na wzrost powierzchni kontaktu z medium.



Rys. 56. Obrazy SEM (powiększenie x5000) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PDLGA/PCU zawierających 5% SLM

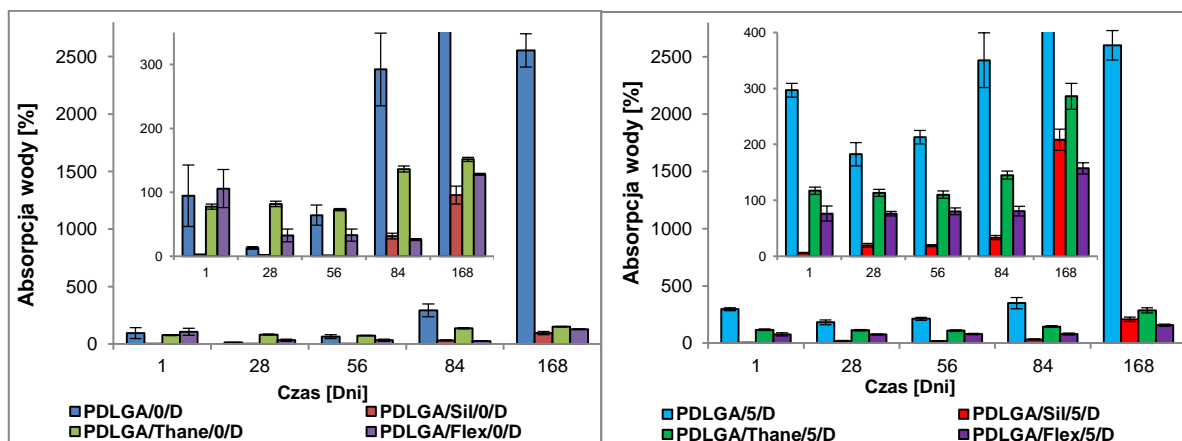
W przypadku niezmodyfikowanego materiału odniesienia, po 84 dniach nastąpił wzrost porowatości mikrowłókien PDLGA, sugerujący szybsze uwalnianie SLM, niż w przypadku włókniny otrzymanej z roztworu w HFIP (Rys. 56B). Część włókien uległa pęknięciu, a ich rozmiary wzrosły o 57%. Po 168 dniach nastąpiła utrata struktury włóknistej. Część mikrowłókien połączyła się tworząc zwartą masę o rozwiniętej i porowatej powierzchni. Miejscami można było również zaobserwować puste w środku fragmenty włókien, świadczące o erozji kopoliestru w masie (Rys. 56C).

Jak przedstawiono na Rys. 56, we włókninach dwuskładnikowych PDLGA/PCU, po wprowadzeniu SLM, zmiany w morfologii były mniej widoczne niż w przypadku włókien zawierających DiNa. Po 84 dniach, w żadnym z wariantów nie zaobserwowano znaczącego wzrostu porowatości PDLGA oraz nie wystąpiło uszczelnienie powierzchni materiału, pomimo niewielkiego skurczu. We wszystkich przypadkach rozmiary mikrowłókien uległy zwiększeniu. W materiale PDLGA/Sil/5/D było to 51%, co stanowiło największą wartość spośród wyników uzyskanych po zastosowaniu modyfikatora PCU. Wprowadzenie higroskopijnych nanowłókien HydroThane ponownie spowodowało najmniejsze pęcznienie, wynoszące 19%. Również w tym przypadku włókna PDLGA w dużej mierze popękały i pokruszyły się. We włókninie zawierającej ChronoFlex, rozmiary włókien kopoliestrowych wzrosły o 26%. Po 168 dniach we wszystkich przypadkach utracona została struktura włókien PDLGA. Zdegradowany polimer połączył się tworząc litą masę. Ślady erozji były jednak niewielkie, za to dość mocno uszczelniona została powierzchnia zewnętrzna każdej z próbek.

Podsumowując, zaobserwowano, że uzyskanie porowatych włókien PDLGA o większych rozmiarach, w znacznym stopniu wpłynęło na zmiany w morfologii włókien w trakcie degradacji hydrolitycznej. Grubsze włókna prawdopodobnie silniej promowały erozję w masie, ze względu na wydłużenie drogi dyfuzji kwaśnych produktów degradacji do otoczenia. Rozwinięcie powierzchni zewnętrznej ułatwiło kontakt kopolimeru z medium, dzięki czemu woda mogła łatwiej wnikać do włókien PDLGA. Jednocześnie wzrost ich średnic spowodował zmniejszenie się wolnych przestrzeni, co mogło wpłynąć na chłonność próbek. Wyjątek stanowił materiał odniesienia, gdyż ze względu na szybsze zestalanie się włókien przędzonych z roztworów w DCM, w tym przypadku uzyskano dużo luźniejszą strukturę, którą można zauważyć na Rys. 58. Wprowadzone nanowłókna PCU zadziałały tu jak czynnik utrzymujący spójność materiału, ponieważ zauważalnie wzrosła gęstość objętościowa próbek. Wprowadzone do matrycy leki wpłynęły na obserwacje morfologii w analogiczny sposób jak w przypadku włókien, w których PDLGA przędzono z roztworów w HFIP (Rozdział 15.1.1). W połączeniu z większą porowatością wynikającą z użycia DCM podczas elektroprzędzenia, uwolnienie łatwo rozpuszczalnej soli sodowej diklofenaku zwiększyło rozwinięcie powierzchni mikrowłókien matrycy, co przyspieszyło zmiany w morfologii powierzchni. W ogólnym rozrachunku DiNa w większym stopniu wpłynął na zmiany w morfologii niż w *Eksperymencie 1*. Sirolimus ze względu na hydrofobizację materiału zauważalnie ograniczył erozję PDLGA. Tym razem efekt był jednak słabszy niż w przypadku matrycy otrzymanej z HFIP, ze względu na większą powierzchnię kontaktu z medium degradacyjnym, co mogło wpłynąć na zwiększenie szybkości jego uwalniania i tym samym ograniczenie hydrofobizującego wpływu rapamycyny w późniejszych etapach inkubacji.

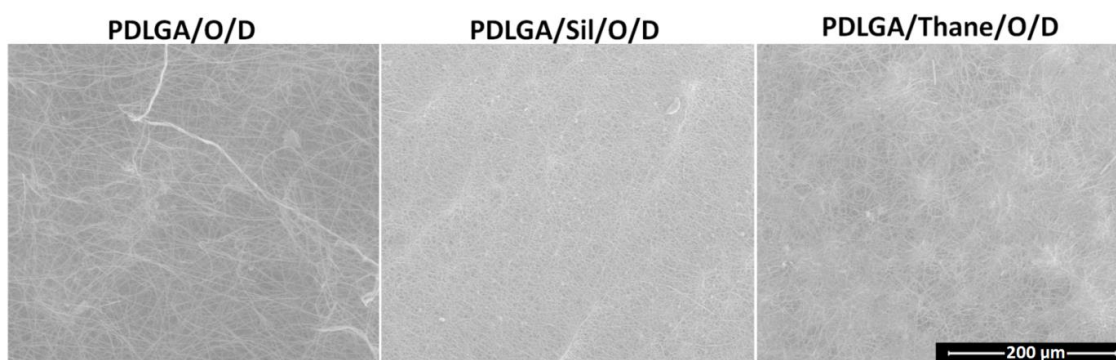
15.2.2. Pomiar absorpcji wody przez włókniwy PDLGA/PCU

Zmiana rozpuszczalnika podczas elektroprzędzenia mikrowłókien PDLGA spowodowała nie tylko rozwinięcie ich powierzchni właściwej na skutek zwiększenia porowatości, lecz również zwiększenie średnic. Odbiło się to na zmniejszeniu objętości przestrzeni pomiędzy włóknami, co wpłynęło na zdolność do absorpcji wody, która w dużym stopniu odbiegała od wyników uzyskanych w *Eksperymentie 1* (Rozdział 15.1.2), co przedstawiono na Rys. 57.



Rys. 57. Średnia ilość zaabsorbowanej wody przez włókniwy bez leków (z lewej) oraz zawierające po 5% wag. DiNa i SLM (z prawej) ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Po zmianie rozpuszczalnika na DCM nastąpiła znaczna poprawa absorpcji wody przez włókninę referencyjną PDLGA/0/D, która już po 24 godzinach wchłonęła $94 \pm 48\%$ wag. medium. Duże odchylenie standardowe świadczyło najprawdopodobniej o trudności z odgazowaniem próbek, ze względu na ich większą porowatość. Pomimo uzyskania włókien o większych średnicach, objętość wolnych przestrzeni nie uległa zmniejszeniu w tym materiale, ze względu na jego luźniejszą strukturę (Rys. 58), co stanowiło wyjątek w *Eksperymentie 2*. Materiał charakteryzował się jednak dużym skurczem w trakcie inkubacji, co spowodowało wzrost gęstości objętościowej włókniny i spadek ilości wchłoniętej po 28 dniach wody do $13 \pm 2\%$. Wartość ta stopniowo rosła i po 84 dniach osiągnęła $292 \pm 57\%$. Po 168 dniach ze względu na znaczną degradację PDLGA, włóknina przyjęła formę żelu, który w dużym stopniu zwiększył swoją objętość, wchłaniając $2553 \pm 145\%$ wody, co było najwyższym rezultatem spośród próbek bez leków.



Rys. 58. Obrazy SEM (x500) porównujące wielkość wolnych przestrzeni pomiędzy włóknami PDLGA

Wprowadzenie przeplotu mikrowłókien PDLGA z nanowłóknami hydrofobowego ChronoSilu początkowo nie wywołało zmian absorpcji wody, w stosunku do swojego odpowiednika otrzymanego w *Eksperymentcie 1*. W tym wariacie modyfikacji ponownie odnotowano najniższą chłonność spośród badanych włókien. Po 24 godzinach było to niecałe 3%, po czym wartość ta zmniejszyła się jeszcze na skutek niewielkiego skurczu struktury do około 1% po 56 dniach. Wraz z postępowaniem degradacji ilość zaabsorbowanej wody zaczęła jednak rosnąć i po 84 dniach wniosła $31 \pm 5\%$, co było ponad trzykrotnie wyższym rezultatem niż w przypadku włókniny, w której włókna kopoliestrowe przędzono z roztworów w HFIP. Zatem, dzięki porowatości uzyskano wzrost chłonności. Po 168 dniach sytuacja uległa jednak zmianie. Ze względu na szczelniejszą strukturę powierzchni włókniny ilość zaabsorbowanego roztworu PBS była mniejsza niż w *Eksperymentcie 1*. Wynosiła $96 \pm 14\%$, co stanowiło najniższy wynik uzyskany w omawianej części badań.

W przypadku materiału zawierającego nanowłókna higroskopijnego HydroThane, ilość wchłoniętej wody od pierwszego do 56 dnia znajdowała się na względnie stałym poziomie wynoszącym $77 \pm 4\%$ wag. Wartość ta była ponad trzykrotnie niższa niż zaobserwowana w przypadku materiału, w którym kopoliestrowe mikrowłókna elektroprzędzono z roztworów w HFIP. Potencjalną przyczyną uzyskania takiego wyniku mogło być zwiększenie się gęstości objętościowej materiału, wynikające ze wzrostu rozmiarów włókien PDLGA po zmianie rozpuszczalnika na DCM. Spowodowało to zmniejszenie objętości wolnych przestrzeni, do których mogłoby wnikać medium degradacyjne. Po 84 dniach chłonność osiągnęła $136 \pm 5\%$, co było drugim najwyższym wynikiem, wśród materiałów niezawierających leków. Ta tendencja utrzymała się końca eksperymentu. Ilość zaabsorbowanej wody po 168 dniach nieznacznie wzrosła, do wartości $151 \pm 3\%$, prawdopodobnie ze względu na erozję PDLGA.

Wprowadzenie nanowłókien najbardziej hydrofilowego PCU – ChronoFlexu początkowo spowodowało wzrost absorpcji wody względem innych włókien. Po 24 godzinach uzyskano najwyższy wynik wynoszący $106 \pm 30\%$. Materiał ten miał jednak tendencję do silnego pęcznienia włókien, na skutek czego nastąpiło uszczelnienie powierzchni zewnętrznej, prowadzące do zmniejszenia ilości zaabsorbowanego roztworu PBS. Po 28 dniach włóknina pobrała jedynie $32 \pm 10\%$ wody. Taka tendencja utrzymywała się do 84 dnia, po czym w wyniku degradacji i erozji frakcji PDLGA chłonność zaczęła wzrastać na skutek napływu medium degradacyjnego pomiędzy włókna poliuretanowe, w miejsca gdzie pierwotnie znajdował się kopoliester. Po 168 dniach materiał PDLGA/Flex/0/D zaabsorbował $128 \pm 1\%$ roztworu PBS, co stanowiło trzeci rezultat spośród badanych włókien.

W Rozdziale 15.2.1 opisano, że trudno rozpuszczalny sirolimus hydrofobizował mikrowłókna PDLGA utrudniając wnikanie do nich wody. Z drugiej strony, dobrze rozpuszczalna sól sodowa diklofenaku generowała powstawanie nanoporów, co prowadziło do rozwinięcia powierzchni włókien, a tym samym zwiększenia kontaktu z medium degradacyjnym. Zatem, ogólny wpływ wprowadzenia leków na ilość zaabsorbowanej wody stanowiła suma efektów działania SLM i DiNa. Po inkorporacji substancji aktywnych do matrycy PDLGA, najlepszą chłonność wykazywała włóknina PDLGA/5/D, która już po 1 dniu zaabsorbowała $297 \pm 6\%$ wody. Na podstawie analizy obrazów SEM (Rys. 55A i Rys. 56A) stwierdzono, że obserwacja ta wynikała prawdopodobnie z największej objętości przestrzeni pomiędzy włóknami, w połączeniu z rozwinięciem ich powierzchni na skutek odparowania

DCM podczas elektroprzędzenia. Tak jak w przypadku włókniny bez leków, uzyskano dość luźną strukturę. Materiał ten wykazywał największą absorpcję wody spośród próbek otrzymanych z wykorzystaniem DCM w całym czasie inkubacji (Rys. 57), także wyższą niż analogiczne włókniwy PDLGA przędzone z HFIP (Rozdział 15.1.2). Ponownie, tak jak w przypadku próbki niezawierającej leków, na skutek pęcznienia włókien i znacznego skurczu, zdolność do wchłaniania wody początkowo zmalała do wartości $182\pm 10\%$ po 28 dniach, a następnie, na skutek degradacji oraz silnej erozji powierzchni wzrosła, by po 84 dniach osiągnąć $350\pm 25\%$. Po 168 dniach uzyskano najwyższy wynik wynoszący $2600\pm 129\%$, ze względu na wytworzenie silnie pochłaniającego wodę żelu.

Gęstsza struktura wewnętrzna włókien zawierających nanowłókna PCU spowodowała, że wykazywały one mniejszą zdolność do wchłaniania wody względem niezmodyfikowanego materiału. Wprowadzenie higroskopijnego HydroThane ponownie spowodowało, że włókniwy zaabsorbowały znacznie większą ilość medium degradacyjnego niż w przypadku zastosowania przeplotu z hydrofobowym ChronoSilem. Prawidłowość ta występowała we wszystkich omawianych do tej pory materiałach, niezależnie od ilości leków i rodzaju rozpuszczalnika, z którego przędzono włókna PDLGA. W przypadku włókniny PDLGA/Thane/5/D zaobserwowano analogiczną sytuację do tej, która pojawiła się w przypadku materiału bez leków. Chłonność nie ulegała większym zmianom od 1 do 56 dnia i wynosiła $113\pm 3\%$, a następnie wzrosła do $145\pm 7\%$. Po 168 dniach przyrost ilości zaabsorbowanej wody był znaczny i wynikał prawdopodobnie z nieco szybszej erozji włókniny zawierającej substancje aktywne. Zaabsorbowała ona $286\pm 23\%$ roztworu PBS, co stanowiło drugi najwyższy wynik spośród badanych materiałów, do których wprowadzono SLM i DiNa. W trakcie inkubacji, chłonność włókniny zawierającej nanowłókna ChronoSil stopniowo rosła. W czasie 84 dni ilość zaabsorbowanej wody ponownie była najniższa (zmiana od $5\pm 1\%$ do $33\pm 4\%$). Po 168 dniach włóknina PDLGA/Sil/5/D wchłonęła $208\pm 19\%$ medium degradacyjnego, co było ponad dwukrotnie większą wartością niż w przypadku analogicznego materiału niezawierającego leków. Zaobserwowano zatem, że wpływ substancji aktywnych był tym przypadku dość wyraźny.

W przypadku modyfikacji włókniny PDLGA za pomocą nanowłókien najbardziej hydrofilowego poliuretanu ChronoFlex, ilość roztworu PBS zaabsorbowana po 24 godzinach była mniejsza niż w przypadku włókniny niezawierającej leków i wynosiła $76\pm 13\%$. Tym razem, nie odnotowano tak silnego uszczelnienia powierzchni materiału, dzięki czemu ustalił się stan równowagi w transporcie wody w obrębie jego objętości. Pozwoliło to na stabilizację ilości pobranego buforu na poziomie $78\pm 2\%$ do 84 dnia. Po 168 dniach, włóknina wchłonęła nieco większą ilość wody, wnoszącą $157\pm 10\%$, co stanowiło najmniejszą wartość spośród materiałów zawierających leki. Niższy wynik niż uzyskany dla najbardziej hydrofobowego modyfikatora (ChronoSilu) był prawdopodobnie rezultatem silnego uszczelnienia powierzchni od strony mikrowłókien PDLGA zawierających sirolimus (Rys. 56L). Co więcej, nanowłókna ChronoFlex pomimo największej hydrofilowości, w temperaturze inkubacji występowały w stanie szklistym, który charakteryzował się większą gęstością, zatem po częściowym zapadnięciu się struktury włókniny, frakcja PCU mogła utrudniać wnikanie medium degradacyjnego.

Wpływ modyfikatorów PCU na ilość zaabsorbowanej wody był analogiczny do zaobserwowanego w *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.2). Uzyskanie większych średnic włókien PDLGA, za wyjątkiem włókien niezmodyfikowanych, spowodowało zmniejszenie się objętości wolnych przestrzeni i

w rezultacie obniżenie chłonności. Po wprowadzeniu do matrycy leków, ze względu na przyspieszenie procesów erozyjnych ilość zaabsorbowanej wody była wyższa niż w próbkach, które ich nie zawierały. Obserwacje świadczyły o tym, że we włókninach, gdzie stosunek powierzchni do objętości był bardzo duży, ilość wody zaabsorbowanej bezpośrednio przez polimer była mała w porównaniu do tej, która znajdowała się pomiędzy włóknami, nawet pomimo uzyskania większych średnic oraz bardziej rozwiniętej powierzchni i porowatości włókien. Wprowadzając łatwo rozpuszczalną sól sodową diklofenaku, zwiększono ilość wody penetrującej włókna PDLGA, a w przypadku sirolimusu, transport medium inkubacyjnego bezpośrednio do poliestru był utrudniony. Niemniej jednak, objętość buforu PBS w wolnych przestrzeniach pomiędzy włóknami nie ulegała zmianie tak długo, jak długo nie doszło do skurczu i zmniejszenia się ich objętości lub nie nastąpiła erozja biodegradowalnej frakcji polimeru.

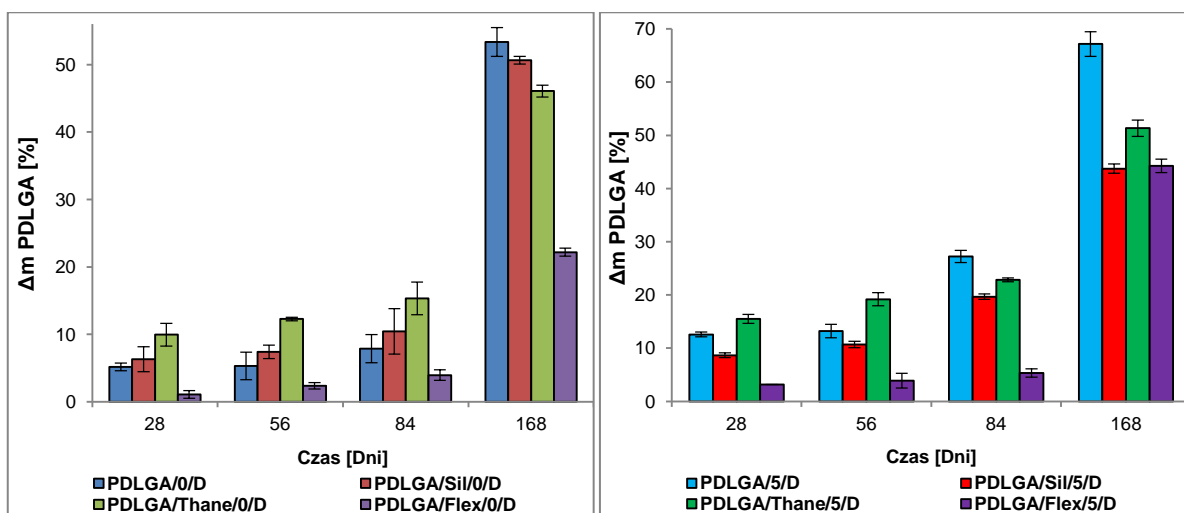
15.2.3. *Badanie szybkości erozji na podstawie ubytku wagowego frakcji PDLGA*

Na skutek procesów degradacji i erozji zarejestrowano ubytek wagowy matrycy PDLGA we wszystkich badanych próbkach (Rys. 59). W przypadku włóknin bez leków, w czasie 84 dni największą zmianę wartości Δm PDLGA obserwowano w przypadku materiału zmodyfikowanego za pomocą higroskopijnych nanowłókien HydroThane. Wynik ten nie był zgodny z przewidywaniami, gdyż w przypadku analogicznego materiału, otrzymanego przy użyciu roztworów z HFIP, ubytek wagowy w tym wariantcie modyfikacji włókniny był najniższy. W *Eksperymencie 1* stwierdzono, że nanowłókna HydroThane promowały mechanizm erozji heterogenicznej. Najwyraźniej rozwinięcie powierzchni kopoliestrowych mikrowłókien spowodowało, że proces ten znacznie przyspieszył. We włókninie PDLGA/Thane/0/H po 84 dniach Δm wynosiło $6\pm 1\%$, zaś po zmianie HFIP na DCM, już po 28 dniach uzyskano $10\pm 1\%$ ubytku wagowego matrycy, natomiast po 84 dniach było to $15\pm 1\%$. Po 168 dniach materiał otrzymany z wykorzystaniem bardziej lotnego rozpuszczalnika w dalszym ciągu wykazywał o wiele szybsze tempo erozji. Uzyskana wartość Δm wynosząca $46\pm 3\%$, w odniesieniu do pozostałych włóknin badanych w *Eksperymencie 2*, sugerowała jednak spowolnienie procesu degradacji względem próbek PDLGA/0/D i PDLGA/Sil/0/D. Biorąc pod uwagę niemal całkowity rozkład kopoliestru przy powierzchni (Rys. 54I) oraz jej nieco mniejsze uszczelnienie niż w innych materiałach, można przypuszczać, że za sprawą higroskopijności nanowłókien HydroThane transport wody w głąb struktury oraz produktów hydrolizy do otoczenia był sprawniejszy, niż w przypadku pozostałych włóknin. Mogło to ograniczyć autokatalizę, której udział z pewnością wpłynął na zmianę wagi matrycy w niezmodyfikowanym materiale odniesienia oraz zawierającym ChronoSil.

W przypadku wprowadzenia do materiału nanowłókien ChronoSil, ubytek wagowy PDLGA był nieco mniejszy niż we włókninie PDLGA/Thane/0/D. Po 84 dniach wynosił $10\pm 1\%$, co było jednak wyższym rezultatem, niż uzyskany w przypadku niezmodyfikowanego materiału odniesienia ($8\pm 2\%$). Po 168 dniach sytuacja uległa odwróceniu. To włóknina PDLGA/0/D wykazywała nieznacznie większą wartość Δm , wynoszącą $53\pm 2\%$, przy $51\pm 1\%$ dla materiału zawierającego hydrofobowy ChronoSil. Porównując wyniki uzyskane dla obu próbek z ich odpowiednikami otrzymanymi z wykorzystaniem HFIP (Rys. 38), można było zauważyć, że mikrowłókna PDLGA otrzymane z roztworów w DCM charakteryzowały się wolniejszą erozją. Było to prawdopodobnie spowodowane znacznym zmniejszeniem się stosunku powierzchni do objętości włóknin. Spowodowało to promowanie

mechanizmu erozji homogenicznej, który charakteryzuje się mniejszym ubytkiem wagi materiału, ponieważ oligomery z jego wnętrza mogą być uwolnione dopiero przy niewielkiej masie molowej umożliwiającej ich rozpuszczenie. Skutkuje to powstawaniem struktur pustych w środku, co zaobserwowano np. na Rys. 54C.

Najwolniejsze zmiany Δm PDLGA zanotowano w przypadku włókniny zawierającej najbardziej hydrofilowe nanowłókna ChronoFlex. Ubytek wagowy na każdym etapie inkubacji był o wiele mniejszy w porównaniu do pozostałych materiałów. Po 84 dniach wynosił $4 \pm 1\%$, a po 168 dniach było to $22 \pm 1\%$. Taki rezultat mógł sugerować największy udział mechanizmu erozji w masie spośród badanych w tym eksperymencie włókien.



Rys. 59. Średni ubytek wagi matrycy PDLGA (Δm PDLGA) podczas degradacji hydrolytycznej i erozji włókien bez leków (z lewej) oraz zawierających po 5% SLM i DiNa (z prawej) ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Wprowadzenie po 5% SLM oraz DiNa do matrycy PDLGA spowodowało, że uzyskano wyższe wyniki ubytku wagowego kopoliestru, zarówno względem materiałów niezawierających leków, jak i swoich odpowiedników otrzymanych z wykorzystaniem roztworów w HFIP. Należy jednak pamiętać, że oprócz procesów związanych z degradacją miało w tym przypadku miejsce uwalnianie leków, które również wpłynęło na uzyskane rezultaty. Szczególnie znaczenie miała obecność soli sodowej diklofenaku, która szybko uwalniając się z włókniny sprzyjała erozji PDLGA poprzez zwiększanie porowatości mikrowłókien. Tym razem, największą wartość Δm PDLGA zaobserwowano w przypadku włókniny niezmodyfikowanej PCU. Do 56 dnia erozja w tym materiale zachodziła mniej intensywnie niż w przypadku PDLGA/Thane/5/D, jednak po 84 dniach waga matrycy zmniejszyła się o $27 \pm 2\%$, przy $23 \pm 2\%$ uzyskanych w przypadku włókniny zawierającej nanowłókna HydroThane. Po 168 dniach tendencja nie uległa zmianie. W próbce PDLGA/5/D zanotowano najwyższą wartość Δm kopoliestru w *Eksperymentie 2*, wynoszącą $67 \pm 2\%$, a dla materiału zawierającego HydroThane było to $51 \pm 1\%$.

Wprowadzenie leków do włókniny PDLGA zmodyfikowanej nanowłóknami ChronoSil spowodowało, że po 84 dniach uzyskano $20 \pm 1\%$ ubytku wagi matrycy. Co ciekawe, po 168 dniach Δm miało mniejszą wartość niż we włókninie niezawierającej substancji aktywnych. Prawdopodobnie, wprowadzenie kolejnego czynnika hydrofobizującego, jakim był sirolimus do materiału zawierającego

hydrofobowe nanowłókna ChronoSil spowolniło procesy erozyjne (obecność 2 czynników zmniejszających powinowactwo włókniny do wody). Ubytek wagowy ostatecznie wyniósł $44\pm 1\%$, co było znacznie wyższym wynikiem niż dla analogicznej włókniny wytworzonej w *Eksperymencie 1* ($32\pm 1\%$).

Ponownie, erozja zachodziła najwolniej w przypadku włókniny zawierającej nanowłókna ChronoFlex. Po 84 dniach było to $5\pm 1\%$. Niewielki wzrost Δm PDLGA w stosunku do włókniny bez leków mógł jednak wynikać z uwalniania SLM oraz DiNa. Po 168 dniach ubytek wagowy wynosił tyle samo, jak w przypadku materiału zawierającego ChronoSil, czyli $44\pm 4\%$. Stanowiło to największy wzrost Δm w porównaniu do wariantu bez leków.

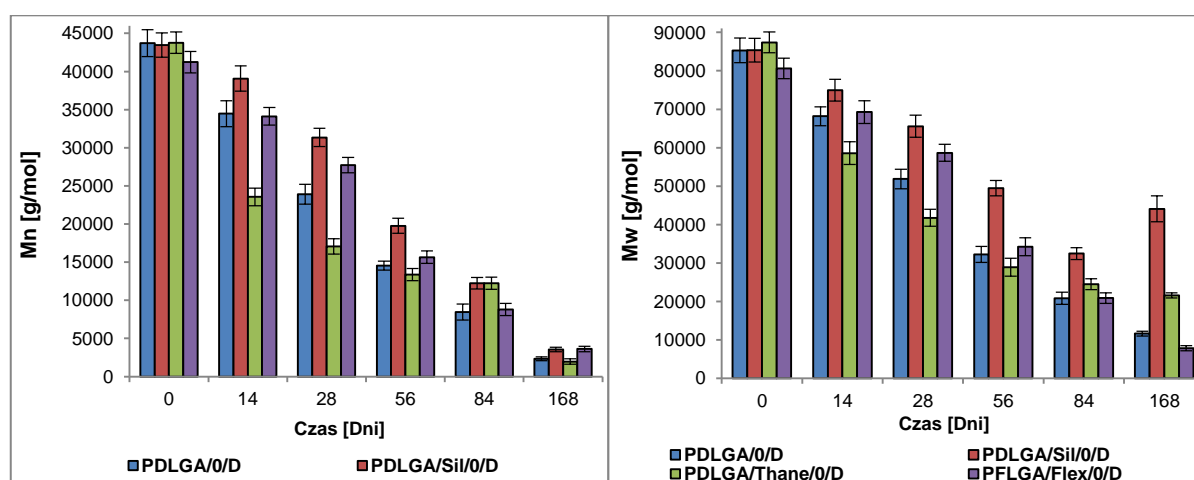
Elektroprzędzenie mikrowłókien PDLGA z roztworów w DCM w znacznym stopniu wpłynęło na szybkość procesów erozyjnych. Z jednej strony, ze względu na znaczny wzrost ich porowatości uzyskano rozwinięcie powierzchni właściwej. Zwiększenie kontaktu z medium degradacyjnym premiowało mechanizm erozji powierzchniowej. Z drugiej strony, kopoliestrowe mikrowłókna posiadały większe średnice, co spowodowało wydłużenie drogi dyfuzji kwaśnych produktów degradacji do otoczenia. W połączeniu z pęcznieniem włókien PDLGA oraz skurczem włókniny skutkującym wzrostem jej gęstości objętościowej, zwiększało to wpływ procesu autokatalizy, charakterystycznego dla erozji w masie. Uzyskane wyniki stanowiły zatem wypadkową szybkości obu mechanizmów, które były zależne zarówno od zdolności włóknin do absorbowania wody, jak również kinetyki reakcji hydrolizy. W przypadku badania włóknin, należy mieć również na uwadze, że na początku degradacji erozja heterogeniczna miała większy udział, ponieważ woda docierała do powierzchni w pierwszej kolejności. Później zaś sytuacja mogła ulegać dynamicznym zmianom, w zależności od właściwości badanego materiału. Wprowadzenie leków dało taki sam efekt jak w *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.3). DiNa rozpuszczając się spowodował rozwinięcie powierzchni mikrowłókien PDLGA, które wykazywały porowatość po procesie elektroprzędzenia. SLM zaś hydrofobizując matrycę nie sprzyjał dyfuzji wody w jej głąb, co hamowało degradację i erozję materiału. Niemniej jednak, rola sirolimusu była mniejsza, o czym świadczył wzrost porowatości włókien do których był wprowadzony ten lek, co sugerowało przyspieszenie jego uwalniania.

15.2.4. Badanie zmian średnich mas molowych oraz dyspersyjności PDLGA podczas degradacji hydrolitycznej

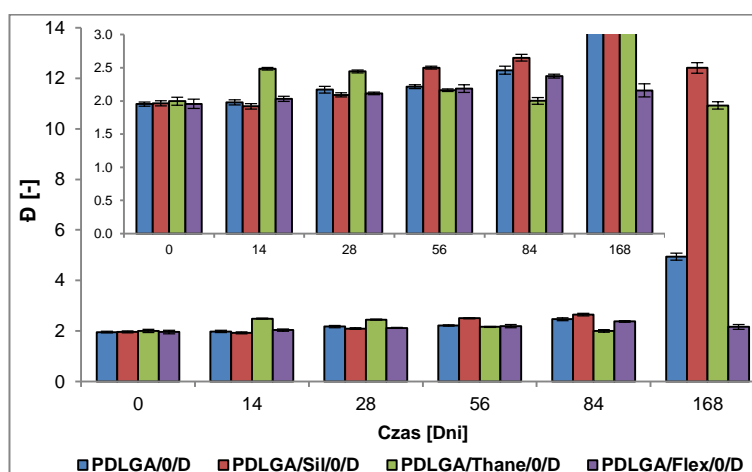
W celu ustalenia wpływu rozwinięcia powierzchni właściwej włókien PDLGA na szybkość procesu degradacji hydrolitycznej, za pomocą chromatografii GPC analizowano zmiany liczbowo średnich (\overline{M}_n) i wagowo średnich (\overline{M}_w) mas molowych biodegradowalnej frakcji kopoliestrowej (Rys. 60).

Zaobserwowano, że w przypadku włókniny referencyjnej PDLGA/0/D, większa porowatość włókien wpłynęła na przyspieszenie procesu degradacji w czasie 84 dni, względem swojego odpowiednika otrzymanego z roztworu w HFIP (Rys. 40). Wartość \overline{M}_n spadła o 81% z 43700 ± 1800 g/mol do 8500 ± 1000 g/mol (w przypadku włókniny elektroprzędzonej z HFIP było to 73%). Zmiana \overline{M}_w była nieco mniejsza, wynosiła bowiem 76% (71% dla PDLGA/0/H), co odpowiadało spadkowi średnich mas molowych z 85300 ± 3300 g/mol do 20800 ± 1600 g/mol. Wzrost dyspersyjności z $1,95\pm 0,03$ do $2,46\pm 0,06$ świadczył o utrudnionym odprowadzaniu produktów degradacji do medium, co wynikało

z uzyskania większych rozmiarów włókien (Rys 61). Po 168 dniach zaobserwowano spowolnienie degradacji względem włókniny otrzymanej z roztworów w HFIP, która uległa całkowitemu rozkładowi do oligomerów o masach poniżej 1000 g/mol. Po zmianie rozpuszczalnika na DCM, średnie wartości \overline{M}_n i \overline{M}_w wynosiły odpowiednio 2300 ± 250 g/mol i 11600 ± 650 g/mol (Đ $4,94 \pm 0,14$). Elugramy przedstawiały jednak bimodalny rozkład mas molowych. Można było wyróżnić frakcje oligomerów o \overline{M}_w 550 ± 50 g/mol (Đ $1,10 \pm 0,05$) oraz łańcuchy o wyższej masie molowej \overline{M}_w 13300 ± 200 g/mol (Đ $2,42 \pm 0,11$) (Tabela 34). Taki wynik tłumaczyły obrazy SEM (Rys. 54C) pokazujące, że uzyskano puste w środku struktury, świadczące o degradacji włókien PDLGA w masie. Hydroliza łańcuchów PDLGA zachodziła dużo szybciej wewnątrz włókien na skutek efektu autokatalizy, natomiast bliżej powierzchni, ze względu na dostępność buforu PBS znajdującego się w medium degradacyjnym, proces ten miał zdecydowanie mniejszy wpływ (stabilizacja pH środowiska).



Rys. 60. Zmiany liczbowo średniej masy molowej (M_n) oraz wagowo średniej masy molowej (M_w) PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej ($\bar{x} \pm SD$; $N=3$)



Rys. 61. Zmiany dyspersyjności PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej ($\bar{x} \pm SD$; $N=3$)

Włóknina referencyjna, dopiero od 84 dnia wykazała najwyższą zmianę średnich mas molowych spośród badanych materiałów. Do tego czasu, najszybciej degradującym materiałem był

PDLGA/Thane/0/D. Nie było to zgodne z oczekiwaniami, ponieważ w *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.4) to właśnie włóknina zmodyfikowana higroskopijnym HydroThane degradowała najwolniej. Po rozwinięciu powierzchni właściwej włókien PDLGA zaobserwowano skokową zmianę mas molowych, w szczególności \overline{M}_n z 43800 ± 1400 g/mol do 17100 ± 1000 g/mol (spadek aż o 61%) w czasie 28 dni. \overline{M}_w zmieniło się w nieco mniejszym stopniu, z 87400 ± 2700 g/mol do 41700 ± 2200 g/mol. Wzrost dyspersyjności z $2,00 \pm 0,06$ do $2,44 \pm 0,02$ świadczył o powstaniu niskocząsteczkowej frakcji, która była widoczna na elugramach, w postaci bimodalnego rozkładu mas molowych. Rozwinięcie powierzchni włókien oraz wzrost ich rozmiarów spowodowały w tym przypadku nie tylko silną degradację w masie, lecz również erozję powierzchniową, co sugerowała zmiana Δm frakcji biodegradowalnej (Rys. 59). Od 56 dnia sytuacja uległa zmianie – rozkład mas z powrotem stał się monomodalny a \overline{D} zmniejszyła się do $2,16 \pm 0,02$. Warto podkreślić, że do 56 dnia była to najszybciej degradująca próbka, biorąc pod uwagę zarówno *Eksperyment 1* jak i *Eksperyment 2*. W późniejszym etapie inkubacji, szybkość degradacji uległa zmniejszeniu, chociaż w dalszym ciągu masy molowe były znacznie niższe niż dla włókniny PDLGA/Thane/0/H. Po 84 dniach wartości \overline{M}_n i \overline{M}_w wynosiły odpowiednio 12200 ± 800 g/mol i 24400 ± 1400 g/mol (\overline{D} $2,00 \pm 0,05$), co stanowiło drugi rezultat. Tendencja ta utrzymała się do końca eksperymentu. Wartości liczbowo i wagowo średnich mas molowych wynosiły odpowiednio 2000 ± 350 g/mol oraz 21500 ± 650 g/mol. Wysoka dyspersyjność (\overline{D} $10,93 \pm 0,15$), ponownie wynikała z bimodalnego rozkładu mas molowych. Tak jak w przypadku włókniny referencyjnej, powstała frakcja oligomerów o \overline{M}_w 650 ± 100 g/mol (\overline{D} $1,30 \pm 0,02$) i druga o wyższej masie molowej, wynoszącej \overline{M}_w 28800 ± 1300 g/mol (\overline{D} $3,89 \pm 0,10$) (Tabela 34). Główna przyczyna takich obserwacji była jednak prawdopodobnie inna. Włóknina wykazywała bardzo silną erozję przy powierzchni, co mogło sugerować, że w warstwach zewnętrznych powstały oligomery, natomiast bliżej rdzenia materiału degradacja mogła zachodzić wolniej.

Tabela 34. Średnie masy molowe frakcji PDLGA po 168 dniach degradacji hydrolitycznej ($\bar{x} \pm \text{SD}$; N=2)

Włóknina	\overline{M}_n [g/mol]	\overline{M}_w [g/mol]	\overline{D} [-]
PDLGA/0/D	5500 ± 300	13300 ± 200	$2,42 \pm 0,11$
	500 ± 50	550 ± 50	$1,10 \pm 0,05$
PDLGA/Sil/0/D	52300 ± 1600	84600 ± 1000	$1,62 \pm 0,06$
	3600 ± 300	6200 ± 600	$1,72 \pm 0,05$
	500 ± 50	550 ± 100	$1,10 \pm 0,03$
PDLGA/Thane/0/D	7400 ± 600	28800 ± 1300	$3,89 \pm 0,10$
	500 ± 50	650 ± 100	$1,30 \pm 0,02$
PDLGA/Flex/0/D	3600 ± 250	7800 ± 500	$2,17 \pm 0,04$

Modyfikacja włókniny PDLGA za pomocą hydrofobowych nanowłókien ChronoSil w największym stopniu spowolniła degradację hydrolityczną spośród badanych w *Eksperymencie 2* materiałów. Proces ten przebiegał wolniej, również w porównaniu do swojego odpowiednika otrzymanego z wykorzystaniem roztworów w HFIP. Wzrost dyspersyjności do 84 dnia (z $1,96 \pm 0,04$ do $2,65 \pm 0,05$) świadczył o słabym odprowadzaniu produktów degradacji do otoczenia. Po tym czasie \overline{M}_n wyniosło 12200 ± 800 g/mol a \overline{M}_w 32400 ± 1500 g/mol. Po 168 dniach degradacji hydrolitycznej uśrednione

wartości tych parametrów miały wartości 3600 ± 550 g/mol i 44100 ± 3400 g/mol. Dyspersyjność PDLGA była bardzo duża i wynosiła $12,41 \pm 0,21$. W rzeczywistości na elugramie można było wyszczególnić aż trzy frakcje polimeru, w znacznym stopniu różniące się masami molowymi. Na skutek hydrolizy powstały oligomery o \overline{M}_w 550 ± 100 g/mol (Đ $1,10 \pm 0,03$) oraz niskocząsteczkowa frakcja polimeru o \overline{M}_w 6200 ± 600 g/mol (Đ $1,72 \pm 0,05$). Zaobserwowano również, że część PDLGA nie uległa hydrolizie. Wykazywała ona wyjściową wartość \overline{M}_w wynoszącą 84600 ± 1000 g/mol (Đ $1,62 \pm 0,06$), dlatego też nastąpił wzrost średniej wartości wagowo średniej masy molowej w stosunku do rezultatu uzyskanego po 84 dniach. Analogiczna sytuacja miała miejsce w przypadku włókniny zawierającej ChronoSil, w której mikrowłókna PDLGA otrzymano z roztworów w HFIP, przy czym, w tamtym przypadku powstały dwie frakcje polimeru, gdzie mniejszy udział wagowy miała ta o większej masie molowej. Wy tłumaczenie tego zjawiska może być takie samo jak w przypadku włókniny zawierającej HydroThane. Tym razem jednak, ze względu na hydrofobowość nanowłókien ChronoSil oraz zapadnięcie się struktury, woda prawdopodobnie nie została przetransportowana do wewnętrznych warstw, blisko rdzenia, więc nie zaszła tam hydroliza PDLGA. Bliżej powierzchni zewnętrznych powstały zaś frakcje o niższej masie molowej.

W przypadku modyfikacji za pomocą najbardziej hydrofilowych nanowłókien ChronoFlex, proces degradacji hydrolitycznej kopoliestru początkowo przebiegał stosunkowo powoli. Do 56 dnia inkubacji, zmiany średnich mas molowych były szybsze jedynie od tych, które zaobserwowano w materiale PDLGA/Sil/0/D. Włóknina PDLGA/Flex/0/D wykazywała najmniejsze różnice dyspersyjności spośród próbek zawierających modyfikator w formie nanowłókien PCU, co mogło świadczyć o dość równomiernej szybkości degradacji w całej objętości materiału, potwierdzając wcześniejsze założenie dotyczące erozji homogenicznej PDLGA. Po 84 dniach proces rozkładu przyspieszył, co również jest cechą charakterystyczną degradacji w masie. Średnie masy molowe były porównywalne do uzyskanych we włókninie odniesienia i wynosiły 8800 ± 1000 g/mol (\overline{M}_n) i 20800 ± 1300 g/mol (\overline{M}_w). Po 168 dniach, materiał ten jako jedyny posiadał monomodalny rozkład mas molowych, które wynosiły odpowiednio 3600 ± 250 g/mol (\overline{M}_n) i 7800 ± 500 g/mol (\overline{M}_w), co stanowiło najmniejszy wynik, biorąc pod uwagę uśrednione wartości.

15.2.5. Badanie zmian składu molowego PDLGA w czasie degradacji hydrolitycznej

Za pomocą spektroskopii NMR analizowano zmiany składu molowego PDLGA w czasie degradacji hydrolitycznej. Celem przeprowadzenia pomiarów była obserwacja wpływu rozwinięcia powierzchni właściwej włókien kopoliestru na proces hydrolizy wiązań estrowych w kopoliestrze.

W Tabeli 35 przedstawiono molowy stosunek jednostek laktydylowych (LL) do glikolidylowych (GG) zmieniający się w czasie inkubacji. Porównując uzyskane dane do Tabeli 25, w której przedstawiono wyniki dla PDLGA otrzymanego z roztworów w HFIP, można było zaobserwować, że w przypadku materiałów, do których nie wprowadzono leków różnice nie były istotne. Włóknina odniesienia oraz zawierająca nanowłókna ChronoFlex wykazywały zwiększenie zawartości mikrobloków laktydylowych o 1% mol po 84 dniach. W materiale PDLGA/Thane/0/D taka sama zmiana wystąpiła szybciej, bo już po 28 dniach, a włóknina zawierająca hydrofobowy ChronoSil miał ten sam skład molowy przez 84 dni. Po 168 dniach wbrew oczekiwaniom nie nastąpiły duże zmiany

stosunku LL:GG w materiale PDLGA/0/D. Skład molowy kopoliestru był dokładnie taki sam jak przy poprzednim pomiarze. W przypadku włóknin zmodyfikowanych za pomocą ChronoSilu oraz HydroThane sytuacja również nie uległa znaczącej zmianie. W pierwszym przypadku wzrost zawartości jednostek laktydylowych wynosił 2% a drugim 1% mol, co w rezultacie, w obu materiałach dało taki sam skład PDLGA wynoszący 81:19% mol (LL:GG). Przyczyną niewielkich zmian było uzyskanie po 168 dniach degradacji, frakcji kopoliestru znacznie różniących się wartościami średnich mas molowych, co zostało opisane w Rozdziale 15.2.4. Semiblokowa struktura PDLGA w połączeniu z dość niewielką średnią długością bloków laktydylowych ($L_{LL}^e 5,53$) i glikolidylowych ($L_{GG}^e 1,47$) spowodowała, że z punktu widzenia statystyki rozkładu poszczególnych merów w łańcuchu, zmiany w składzie mogły być widocznie jedynie w przypadku oligomerów o niewielkiej długości łańcucha, co miało miejsce np. we włókninie PDLGA/0/H (Tabela 25). Należy pamiętać, że w trakcie pomiaru metodą NMR otrzymano uśredniony wynik dla wszystkich frakcji kopolimeru we włókninie, co w rezultacie spowodowało, że nie obserwowano znaczących zmian składu molowego. Z tego też względu, w przypadku materiału, do którego wprowadzono nanowłókna ChronoFlex zaobserwowano wzrost zawartości merów laktydylowych wynoszący 6% mol. Kopolimer PDLGA w tym materiale degradował dość równomiernie w całej objętości, o czym świadczyły bardzo małe zmiany w dyspersyjności (Rys. 61) oraz monomodalny rozkład mas molowych uzyskany po 168 dniach (Tabela 34). Brak obecności wysokocząsteczkowej frakcji kopolimeru spowodował, że możliwe było zaobserwowanie zmiany jego składu molowego.

Tabela 35. Zmiany składu molowego kopoliestru PDLGA w czasie degradacji hydrolytycznej

Skład włókniny	Stosunek molowy LL:GG [%]				
	Dzień 0	Dzień 28	Dzień 56	Dzień 84	Dzień 168
PDLGA/0/D	79:21	79:21	79:21	80:20	80:20
PDLGA/5/D	79:21	80:20	83:17	83:17	80:20
PDLGA/Sil/0/D	79:21	79:21	79:21	79:21	81:19
PDLGA/Sil/5/D	79:21	81:19	82:19	82:18	82:18
PDLGA/Thane/0/D	79:21	80:20	80:20	80:20	81:19
PDLGA/Thane/5/D	79:21	83:17	85:15	87:13	81:19
PDLGA/Flex/0/D	79:21	79:21	79:21	80:20	86:14
PDLGA/Flex/5/D	79:21	84:15	88:12	94:6	99:01

Wprowadzenie leków do matrycy PDLGA spowodowało znacznie większe zmiany składu molowego w czasie 84 dni degradacji hydrolytycznej. W przypadku materiału referencyjnego PDLGA/5/D już po 56 dniach zawartość jednostek glikolidylowych zmniejszyła się o 4% mol, a dla PDLGA/Sil/5/D było to 3%. Włókniny, do których wprowadzono nanowłókna HydroThane oraz ChronoFlex wykazywały jeszcze większe zmiany. W pierwszym przypadku już po 28 dniach udział molowy jednostek laktydylowych wzrósł o 4% mol, a ostatecznie uległ zwiększeniu o 8%. W drugim zaś, po 28 dniach ich zawartość wzrosła o 5% mol, a finalnie zwiększyła się o 15%, co było najwyższym wynikiem uzyskanym po 84 dniach. Rezultaty świadczyły o przyspieszeniu degradacji PDLGA w obecności leków, zwłaszcza łatwo rozpuszczalnej soli sodowej diklofenaku, co było również

obserwowane w przypadku włóknin, w których PDLGA otrzymano z roztworów w HFIP. Jednak w *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.5), ze względu na niższą porowatość włókien kopoliestru oraz większy wpływ hydrofobowego sirolimusu, który spowalniał degradację, zmiany składu molowego były bardzo małe (Tabela 25). Po 168 dniach, w materiale odniesienia oraz zawierającym nanowłókna HydroThane, najprawdopodobniej zaobserwowano wpływ tych samych efektów, które miały miejsce w przypadku włóknin bez leków. Usunięcie oligomerów do otoczenia oraz obecność frakcji PDLGA o wyższej masie molowej mogły tłumaczyć wzrost zawartości mikrobloków laktodylowych o odpowiednio 3% i 6% mol. Włóknina zawierająca ChronoSil nie zmieniła swojego składu. Przyczyny mogły być jednak takie same, a dodatkowym czynnikiem była najwyższa hydrofobowość tego materiału. Jedynie we włókninie PDLGA/Flex/5/D zaobserwowano dalszą zmianę, w kierunku zmniejszenia zawartości jednostek glikolidyloowych w kopolimerze. Skład molowy PDLGA w tym materiale wynosił ostatecznie 99:1, co świadczyło o bardzo zaawansowanej degradacji. W tym przypadku można podejrzewać, że tak jak we włókninie bez leków, hydroliza zachodziła w miarę równomiernie w całej objętości. Uwalnianie substancji aktywnych dodatkowo przyspieszyło proces, ze względu na zwiększanie porowatości mikrowłókien matrycy.

Zaobserwowano, że zmiana rozpuszczalnika podczas elektroprzędzenia w znacznym stopniu wpłynęła na zachowanie się materiału w warunkach degradacji hydrolitycznej. Uzyskanie frakcji PDLGA o różnej długości łańcuchów wpłynęło na średnie składy molowe kopolimeru. Wprowadzenie leków, w diametralnie inny sposób spowodowało zmiany w badanym układzie niż w *Eksperymencie 1*, ze względu na obecność porów we włóknach już przed rozpoczęciem degradacji. Zatem, zmiany morfologii powierzchni mikrowłókien PDLGA, wpływające na szybkość procesów związanych z transportem wody i oligomerów pomiędzy matrycą a medium inkubacyjnym oraz większy udział mechanizmu erozji w masie, były czynnikami, od których zależały uzyskane wyniki.

15.2.6. Analiza zmian właściwości termicznych PDLGA w czasie degradacji hydrolitycznej

Metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej badano wpływ rozwinięcia powierzchni właściwej mikrowłókien PDLGA na zmiany właściwości termicznych w trakcie degradacji hydrolitycznej. W Tabela 36 przedstawiono wartości temperatury zeszklenia (T_g) kopoliestru na poszczególnych etapach inkubacji. Podobnie jak w przypadku *Eksperymentu 1* (Rozdział 15.1.6), przed rozpoczęciem inkubacji zaobserwowano plastyfikację PDLGA po wprowadzeniu nanowłókien poliuretanowych oraz leków.

W przypadku niezmodyfikowanej włókniny PDLGA/0/D wartość T_g nie ulegała zmianom przez 14 dni. Następnie, na skutek zmniejszania się masy molowej oraz plastyfikacji frakcją oligomerów, powstających w wyniku degradacji hydrolitycznej zaczęła maleć, osiągając wartość mniejszą o 3 °C od pierwotnej. Po 168 dniach nie zarejestrowano żadnej zmiany, co było wypadkową, bimodalnego rozkładu mas molowych (Tabela 34) oraz usunięcia łańcuchów o małej masie molowej do otoczenia. Po wprowadzeniu leków, w początkowym okresie inkubacji zaobserwowano wzrost T_g związany z ich uwolnieniem, występujący również w *Eksperymencie 1*. Od 14 do 28 dnia prowadzenia pomiarów, temperatura zeszklenia zmniejszyła się z 52 °C do 51 °C. Prawdopodobnie w wyniku ustalenia się stanu równowagi pomiędzy procesami odpowiedzialnymi za zmiany wartości T_g , wartość ta utrzymała się do samego końca inkubacji. Powstawanie oligomerów powodowało jej obniżenie, zaś ich usuwanie

i zmiany składu molowego w kierunku zwiększenia udziału jednostek laktydylowych, działały w przeciwnym kierunku. Porównując niezmodyfikowane nanowłóknami PCU materiały do swoich odpowiedników otrzymanych z roztworów w HFIP, można zauważyć, że wykazywały one nieco mniejsze zmiany temperatury zeszklenia. Mogło to wynikać ze sprawniejszego transportu produktów degradacji, przynajmniej z regionów bliskich powierzchni zewnętrznej włókniny, gdyż te, które znajdowały się w okolicach jej rdzenia, ze względu na skurcz i zapadnięcie się struktury, mogły zostać w pewnym stopniu odizolowane od medium degradacyjnego, stąd bimodalny rozkład mas molowych PDLGA oraz mniejsze różnice wartości T_g .

Tabela 36. Zmiany wartości T_g PDLGA podczas degradacji hydrolitycznej

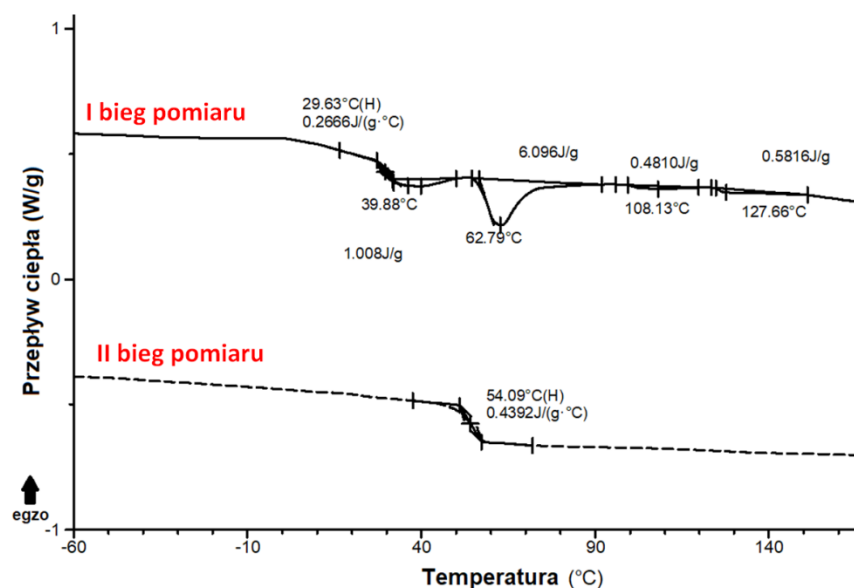
Skład włókniny	Temperatura zeszklenia T_g [°C]									
	0	3 d	7 d	14 d	28 d	42 d	56 d	70 d	84 d	168d
PDLGA/0/D	54	54	54	54	53	53	52	51	51	51
PDLGA/5/D	50	51	51	52	51	51	51	51	51	51
PDLGA/Sil/0/D	53	53	53	48	53	54	51	51	51	53
PDLGA/Sil/5/D	52	52	53	54	55	54	53	52	54	50
PDLGA/Thane/0/D	53	54	56	56	53	53	55	54	53	50
PDLGA/Thane/5/D	52	53	54	53	51	51	50	50	51	49
PDLGA/Flex/0/D	54	55	55	54	53	54	53	52	52	58
PDLGA/Flex/5/D	54	56	55	54	54	54	53	53	54	54

W materiale zmodyfikowanym za pomocą nanowłókien ChronoSil, T_g kopoliestru ulegało okresowym zmianom. Pomiędzy 7 a 14 dniem różnica pomiędzy wartościami temperatury zeszklenia wynosiła 5 °C (spadek), zaś pomiędzy 14 a 42 dniem 6 °C (wzrost). Następnie, po 56 dniach ponownie zaobserwowano obniżenie T_g o 3 °C. Temperatura zeszklenia równa 51 °C była stabilna do 84 dnia, zaś po 168 dniach wróciła do początkowej wartości. Przyczyną tego typu fluktuacji było prawdopodobnie nierównomierne usuwanie do otoczenia nagromadzonych oligomerów, co jest charakterystyczną cechą erozji homogenicznej. Powrót do wyjściowej wartości T_g na końcu eksperymentu wynikał z obecności wspomnianej w Rozdziale 15.2.4. niezdegradowanej frakcji PDLGA. Po wprowadzeniu leków, w początkowym okresie inkubacji do 28 dnia obserwowano podwyższenie temperatury zeszklenia, spowodowane najprawdopodobniej uwalnianiem leków, usuwaniem oligomerów w wyniku rozwinięcia powierzchni włókien PDLGA, a także pewnym spowolnieniem degradacji na skutek obecności sirolimusu. W późniejszym etapie, do 70 dnia zaobserwowano powolny spadek T_g o 3 °C, zaś w przeciągu następnego tygodnia ponownie zanotowano wzrost jej wartości o 2 °C. Finalnie, po 168 dniach temperatura zeszklenia przesunęła się o 4 °C w kierunku niższych wartości. Jak widać, wprowadzenie leków nie zmieniło tendencji do fluktuacji T_g , różnica polegała jedynie na tym, że zaczęły się pojawiać na późniejszym etapie inkubacji. Uzyskane w *Eksperymentcie 1* wyniki dla włókien zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien ChronoSil różniły się w dość znaczący sposób od omówionych powyżej. W przypadku materiału PDLGA/Sil/0/H zmiany miały charakter liniowego spadku wartości T_g , przy czym finalnie uzyskano temperaturę zeszklenia niższą o 11 °C od wartości początkowej. We włókninie PDLGA/Sil/5/H

zaobserwowano tylko jeden punkt, w którym nastąpił zwrot tendencji zmian T_g . Świadczyło to przede wszystkim o słabszej tendencji do usuwania działających plastyfikująco oligomerów z mikrowłókien PDLGA. W przypadku materiałów otrzymanych z wykorzystaniem DCM, transport produktów degradacji odbywał się bardziej cyklicznie, co pewien czas, po osiągnięciu krytycznej masy molowej oligomerów, pozwalającej na ich rozpuszczanie i dyfuzję.

W przypadku włókniny zawierającej nanowłókna HydroThane zaobserwowano wzrost T_g PDLGA już na samym początku eksperymentu. Mogło to mieć związek z szybką degradacją materiału (Rys. 59), co w połączeniu z najszybszą erozją i obniżającą opory dyfuzji znaczną chłonnością wody, spowodowało skuteczne usuwanie niskocząsteczkowej frakcji kopolimeru. Włóknina ta, podobnie jak materiał zawierający nanowłókna ChronoSil, wykazywała pewne fluktuacje temperatury zeszklenia. W tym przypadku miały one jednak mniejsze wartości (nie przekraczały 2 °C). Od 56 dnia obserwowano malejące wartości T_g z 55 °C do 53 °C. Po 168 dniach nastąpiło obniżenie T_g o 3 °C, wynikające z obecności niskocząsteczkowych produktów degradacji w materiale. Po wprowadzeniu leków zmiany miały charakter bardziej liniowy. Do 7 dnia obserwowano wzrost temperatury zeszklenia związany z najbardziej intensywnym okresem uwalniania substancji aktywnych, a następnie stopniowe obniżanie jej wartości z 54 °C do 50 °C po 56 dniach i do 49 °C po 168 dniach. W przypadku analogicznych włókien otrzymanych z wykorzystaniem HFIP, nie obserwowano niemal żadnych zmian T_g w czasie 84 dni, a po zakończeniu inkubacji były bardzo niewielkie, co świadczyło o większym udziale powierzchniowej degradacji i erozji w *Eksperymentie 1*, oraz o sprawniejszym usuwaniu oligomerów do otoczenia ze względu na mniejsze średnice włókien PDLGA.

W przypadku włókniny zawierającej nanowłókna modyfikatora ChronoFlex, w drugim przebiegu pomiaru DSC obserwowano tylko jedną temperaturę zeszklenia (w poprzednich materiałach na krzywych termicznych widoczne było przejście szkliste zarówno PDLGA jak i danego PCU). Pierwszym wnioskiem, jaki wyciągnięto była pewna mieszalność termodynamiczna obu polimerów po stopieniu. W pierwszym biegu, widoczne było zarówno T_g kopoliestru (29,6 °C) jak i efekt endotermiczny pochodzący od ChronoFlexu, związany z przejściem szklistym i silną relaksacją (62,8 °C). Po stopieniu i gwałtownym schłodzeniu próbki uzyskano tylko jedną temperaturę zeszklenia wynoszącą 54,1 °C (Rys. 62). T_g zmierzone osobno dla każdego polimeru wynosiło: 54 °C dla PDLGA i 58 °C dla PCU. W warunkach degradacji hydrolytycznej tylko temperatura zeszklenia kopoliestru ulegała zmianom, lecz zawartość frakcji biodegradowalnych mikrowłókien była coraz mniejsza we włókninie. W przypadku materiału niezawierającego leków, T_g ulegało pewnym fluktuacjom ostatecznie zmniejszając się z 54 °C po 3 dniach do 52 °C po 70 dniach. Przyczyny tych zmian były analogiczne do opisanych w przypadku włókien zawierających inne poliuretany. Po 168 dniach nastąpiło przesunięcie T_g o 6 °C w kierunku wyższych temperatur. Prawdopodobnie ze względu na niewielką zawartość PDLGA we włókninie obserwowano przejście szkliste odpowiadające PCU lub nałożenie się efektów termicznych pochodzących od obu polimerów. Możliwe również, że niskocząsteczkowa frakcja produktów degradacji wykazywała o wiele lepszą mieszalność z ChronoFlexem, stąd nie zaobserwowano powstania drugiego T_g w pierwszym biegu pomiaru. Po wprowadzeniu leków obserwowano mniejsze zmiany temperatury zeszklenia kopoliestru, co sugerowało skuteczniejsze odprowadzanie niskocząsteczkowych produktów degradacji do otoczenia.



Rys. 62. Pierwszy i drugi przebieg pomiaru DSC włókniny PDLGA/Flex/0/D przed degradacją hydrolytyczną

Zaobserwowano, że uzyskanie włókien PDLGA o większych rozmiarach oraz bardziej rozwiniętej powierzchni właściwej spowodowało pewne zmiany we właściwościach termicznych kopoliestru w czasie degradacji hydrolytycznej, względem mikrowłókien gładkich i o mniejszych średnicach, opisanych w Rozdziale 15.1.6. Z jednej strony wydłużyła się droga dyfuzji oligomerów, co sprzyjało obniżaniu wartości temperatury zeszklenia, z drugiej zaś, większa powierzchnia kontaktu z wodnym roztworem PBS ułatwiała transport produktów degradacji do otoczenia, co dawało odwrotną tendencję zmian. Ze względu na ustalenie się stanu równowagi w badanym układzie, część próbek wykazywała fluktuacje T_g , a położenie przejścia szklistego, z wyjątkiem włókniny zawierającej nanowłókna HydroThane, zmieniało się w mniejszym stopniu niż w *Eksperymencie 1*.

15.2.7. Wyznaczanie profili uwalniania leków

Za pomocą chromatografii HPLC badano wpływ zwiększenia porowatości mikrowłókien PDLGA, na kinetykę uwalniania substancji aktywnych. Założeniem eksperymentu było zwiększenie szybkości uwalniania leków, w szczególności sirolimusu, który w *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.7) po wprowadzeniu modyfikatorów PCU uwalniał się bardzo powoli. Dla porównania z włókninami w których matrycę otrzymano z roztworów w HFIP, wprowadzono tylko jedno stężenie SLM i DiNa w nośniku wynoszące 5%, ponieważ bardziej korzystnym i bezpieczniejszym rozwiązaniem jest zwiększenie wydajności uwalniania leków z matrycy, niż wprowadzanie ich w większej ilości. Wydajność enkapsulacji substancji aktywnych we włóknach PDLGA przedstawiono w Tabeli 37.

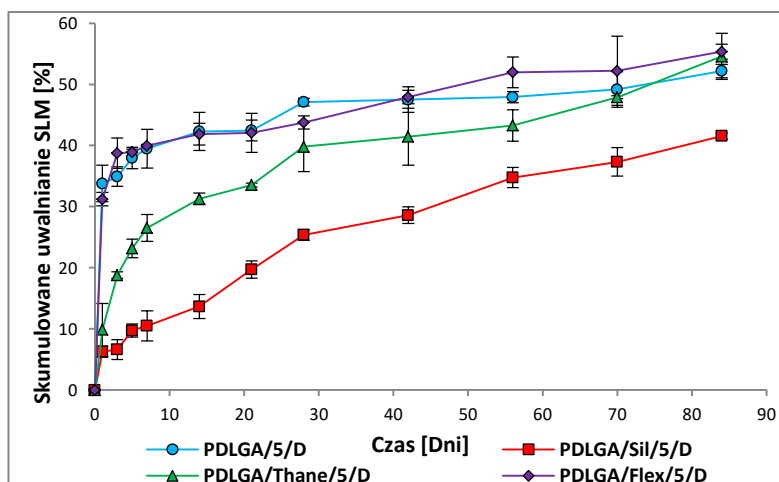
Tabela 37. Wydajność enkapsulacji leków wyrażona w μg leku przypadającą na 1 mg PDLGA ($\bar{x}\pm\text{SD}$; N=5)

Skład włókniny	Zawartość sirolimusu		
	$m_{\text{roztwór}} [\mu\text{g}/\text{mg}]$	$m_{\text{włóknina}} [\mu\text{g}/\text{mg}]$	$W_{\text{enkapsulacji}}^* [\%]$
PDLGA/5/D	51,47±0,51	49,98±0,46	97,11±0,39
PDLGA/Sil/5/D	50,90±0,67	49,10±0,30	96,46±0,52
PDLGA/Thane/5/D	51,21±0,55	49,23±0,43	96,13±0,60
PDLGA/Flex/5/D	52,64±0,49	51,14±0,19	97,15±0,41
Skład włókniny	Zawartość soli sodowej diklofenaku		
	$m_{\text{roztwór}} [\mu\text{g}/\text{mg}]$	$m_{\text{włóknina}} [\mu\text{g}/\text{mg}]$	$W_{\text{enkapsulacji}}^* [\%]$
PDLGA/5/D	52,03±0,88	50,18±0,64	96,44±0,55
PDLGA/Sil/5/D	52,31±0,84	50,75±0,65	97,02±0,50
PDLGA/Thane/5/D	52,44±0,70	50,77±0,29	96,82±0,44
PDLGA/Flex/5/D	51,71±0,75	51,10±0,82	98,82±0,79

$m_{\text{roztwór}}$ – ilość leku przypadająca na 1 mg nośnika w roztworze; $m_{\text{włóknina}}$ – ilość leku przypadająca na 1 mg nośnika we włókninie; W_e – wydajność enkapsulacji wyrażona równaniem $W_e = (m_{\text{włóknina}}/m_{\text{roztwór}}) \cdot 100$

15.2.7.1. Wyznaczanie profili uwalniania sirolimusu (SLM)

Przebieg profili uwalniania rapamycyny w czasie 84 dni inkubacji przedstawiono na Rys. 63. W porównaniu do włókien otrzymanych w *Eksperymencie 1*, po zmianie rozpuszczalnika podczas elektroprzędzenia roztworów PDLGA na DCM, we wszystkich przypadkach zaobserwowano znaczny wzrost szybkości procesu. W materiale odniesienia zawierającym wyłącznie włókna PDLGA, całkowita ilość uwolnionego SLM zwiększyła się z 33±1% (16,90±0,32 $\mu\text{g}/\text{mg}$) do 52±1% (26,09±0,56 $\mu\text{g}/\text{mg}$) względem włókniny PDLGA/5/H. Poza tym, profile uwalniania miały niemal taki sam przebieg. Po początkowym etapie, szybkość procesu uległa znacznemu zmniejszeniu, dając równomierne dawki leku w czasie. Po 7 dniach z PDLGA/5/D uwolnione zostało około 76% wag. ze wspomnianych 26,09±0,56 $\mu\text{g}/\text{mg}$ leku (19,81±3,21 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Było to proporcjonalną wartością do uzyskanej dla włókniny PDLGA/5/H (Rys. 44), która w tym czasie uwolniła około 73% rapamycyny, co odpowiadało jednak tylko 12,72±0,62 $\mu\text{g}/\text{mg}$, ze względu na mniejsze dawki leku.



Rys. 63. Skumulowane uwalnianie sirolimusu (% wag.) z włókien PDLGA/PCU. Początkowe stężenie leku w nośniku wynosiło 5% wag. Mikrowłókna matrycy otrzymano z roztworów w DCM ($\bar{x}\pm\text{SD}$; N=3)

W przypadku włókien zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien PCU, po zmianie rozpuszczalnika z HFIP na DCM zaobserwowano zupełnie inny przebieg profilu uwalniania sirolimusu niż w *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.7.1). Na skutek rozwinięcia powierzchni właściwej włókien PDLGA, szybkość procesu wzrosła. Było to szczególnie dobrze widoczne w przypadku włókniny zmodyfikowanej za pomocą hydrofobowego ChronoSilu, która ponownie charakteryzowała się najwolniejszym uwalnianiem SLM. Tym razem odbywało się ono od pierwszego dnia inkubacji (brak obserwowanej wcześniej inhibicji uwalniania). Sirolimus nie uwalniał się w sposób liniowy, niemniej jednak, uzyskany profil odpowiadający włókninie PDLGA/Sil/5/D był najbardziej do tego zbliżony spośród zbadanych materiałów, o czym świadczyła najwyższa wartość jego dopasowania do modelu zgodnego z kinetyką zerowego rzędu (R_{adj}^2 0,9355). Całkowita ilość uwolnionej po 84 dniach rapamycyny w tym wariantcie modyfikacji zwiększyła się z $2\pm 0\%$ ($1,20 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{mg}$) do $42\pm 1\%$ ($20,85\pm 0,27 \mu\text{g}/\text{mg}$), porównując do siebie włókniny, w których kopoliestrowe mikrowłókna otrzymano odpowiednio z roztworów w HFIP i DCM.

Wzrost szybkości uwalniania w przypadku materiału, do którego wprowadzono bardziej hydrofilowy i higroskopijny HydroThane był mniejszy niż dla ChronoSilu. W czasie 7 dni, uwolnione zostało około 49% z całości rapamycyny wprowadzonej do matrycy, co odpowiadało $13,46\pm 1,12 \mu\text{g}/\text{mg}$. Całkowita ilość uwolnionego SLM wzrosła z $13\pm 1\%$ ($6,50\pm 0,31 \mu\text{g}/\text{mg}$) do $55\pm 4\%$ ($27,71\pm 1,92 \mu\text{g}/\text{mg}$). Jak widać, końcowy wynik był nieco wyższy niż uzyskany dla materiału niezmodyfikowanego, składającego się z wyłącznie z mikrowłókien PDLGA. Przebieg krzywej uwalniania w większym stopniu był zgodny z kinetyką pierwszego niż zerowego rzędu (R_{adj}^2 odpowiednio 0,8933 i 0,7608), jednak skorygowany współczynnik determinacji w obu przypadkach miał wartość niższą niż założone 0,95, co świadczyło o słabym dopasowaniu wyników doświadczalnych do obu modeli matematycznych.

Zmiana rozpuszczalnika na bardziej lotny w roztworach PDLGA na etapie elektroprzędzenia, spowodowała rozwinięcie powierzchni włókien matrycy, co odbiło się na wzroście szybkości uwalniania sirolimusu oraz zmianie kinetyki procesu. Niemniej jednak, uzyskane wyniki pokazały zbliżony wpływ modyfikatorów w postaci nanowłókien PCU o różnej hydrofilowości, niezależnie od morfologii powierzchni nośnika leku. W obu przypadkach uwalnianie SLM było najwolniejsze z włókien, do których wprowadzono ChronoSil, a uzyskane profile uwalniania były najbardziej zbliżone do liniowych, zgodnych z kinetyką zerowego rzędu. Z kolei włókniny zawierające przeplot z nanowłóknami HydroThane, wykazywały pośrednie wartości szybkości uwalniania sirolimusu, przy czym w przypadku zastosowania roztworów w HFIP, przebieg profilu był zbliżony do uzyskanego przez włókninę zawierającą nanowłókna ChronoSilu, a po wykorzystaniu roztworów w DCM bardziej odpowiadał włókninie referencyjnej PDLGA/5/D.

Na potrzeby niniejszego eksperymentu przeprowadzono jeszcze jeden wariant modyfikacji włókniny PDLGA. Tym razem wykorzystano PCU o kącie zwilżania mniejszym niż kopoliestry, wynoszącym $69,0\pm 2,4^\circ$. W ten sposób podjęto próbę przyspieszenia uwalniania względem materiału odniesienia, poprzez zwiększenie powinowactwa włókniny do medium inkubacyjnego. Zabieg ten spowodował jedynie połowiczny sukces. Wprowadzenie nanowłókien ChronoFlex w dość niewielkim stopniu wpłynęło na szybkość uwalniania rapamycyny do 42 dnia. Uzyskany dwufazowy profil

uwalniania był bardzo zbliżony do materiału referencyjnego. Po 7 dniach uwolniło się około 72% z całkowitej ilości uwolnionego SLM, co odpowiadało $20,42 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{mg}$. W dalszym etapie proces miał charakter liniowy, zależny głównie od dyfuzji leku przez matrycę oraz od jej degradacji i erozji powierzchni. W końcowej fazie eksperymentu (od 56 dnia) większa ilość leku uwolniła się z materiału PDLGA/Flex/5/D niż z niezmodyfikowanej włókniny PDLGA/5/D. Po 84 dniach całkowita ilość uwolnionego SLM wynosiła $55 \pm 1\%$ ($28,29 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{mg}$), co stanowiło najwyższy wynik spośród wszystkich badanych w tym eksperymencie materiałów. Otrzymany profil uwalniania w początkowym etapie był zbliżony do uzyskanego dla materiału odniesienia, co wynikało z niewielkiej różnicy hydrofilowości matrycy i modyfikatora, wynoszącej niecałe 5°. Jednak, zastosowanie nanowłókien ChronoFlex w szerszej perspektywie pozwoliło na uwolnienie nieco większej ilości rapamycyny w danym czasie, co było założeniem przy planowaniu tego eksperymentu. Niemniej jednak, uzyskany efekt był niewielki. Wyjaśnieniem mogła być stosunkowo wysoka temperatura zeszklenia wykorzystanego PCU. Pomimo jego hydrofilowości, występowanie w temperaturze inkubacji w stanie szklistym prawdopodobnie nie sprzyjało procesom transportu. W trakcie degradacji, nastąpiło spęcznie włókien PDLGA i ich połączenie w jednolitą masę, stanowiącą podstawę dla poliuretanowych nanowłókien, które tworząc gęstą sieć mogły w pewnym stopniu wydłużać drogę dyfuzji SLM do otoczenia.

Tabela 38. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji R_{adj}^2 przedstawiające dopasowanie wybranych modeli kinetyki uwalniania leków do profili uwalniania sirolimusu oraz stałe szybkości uwalniania (k)

Włóknina	Modele kinetyki uwalniania leku				
	0 rzędu	1 rzędu	Higuchiego	Hixona-Corwella	Korsmeyera-Peppasa
	$R_{adj}^2 (k_0)$	$R_{adj}^2 (k_1)$	$R_{adj}^2 (k_H)$	$R_{adj}^2 (k_{HC})$	$R_{adj}^2 (n; k_{KP})$
PDLGA/5/D	0,3541 (0,305)	0,8621 (1,222)	0,5736 (3,582)	0,3739 (0,002)	0,9929 (0,10; 32,500)
PDLGA/Sil/5/D	0,9355 (0,461)	0,9664 (0,031)	0,9893 (4,558)	0,9533 (0,002)	0,9582 (0,55; 3,742)
PDLGA/Thane/5/D	0,7608 (0,489)	0,8933 (0,117)	0,9312 (5,162)	0,7917 (0,002)	0,9982 (0,34; 12,641)
PDLGA/Flex/5/D	0,4310 (0,346)	0,8494 (0,976)	0,6322 (3,918)	0,4509 (0,002)	0,9910 (0,08; 33,410)

k_0 – stała szybkości uwalniania zerowego rzędu; k_1 – stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu; k_H – stała szybkości uwalniania Higuchiego; k_{HC} – stała szybkości uwalniania Hixona-Corwella; k_{KP} – stała szybkości uwalniania Korsmeyera-Peppasa; n – współczynnik uwalniania Korsmeyera-Peppasa;

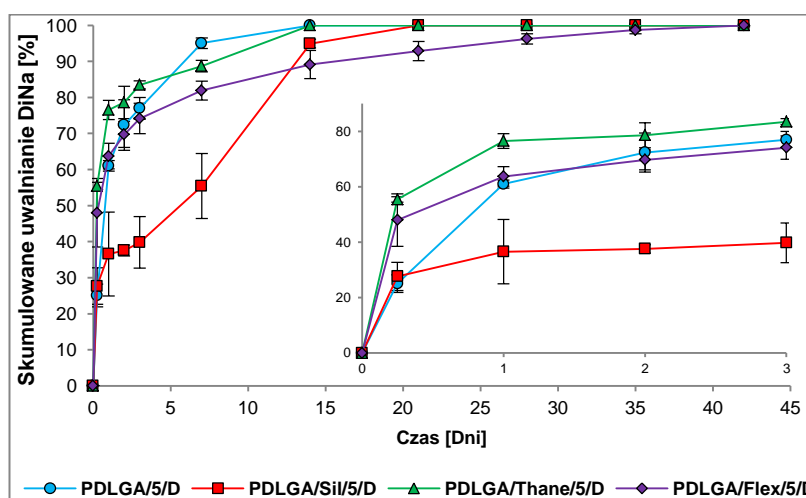
Kinetyka uwalniania rapamycyny we wszystkich materiałach była zgodna jedynie z modelem Korsmeyera-Peppasa. Poza włókniną zawierającą nanowłókna ChronoSil, dopasowanie profili uwalniania do pozostałych modeli było niewystarczające, aby rozpatrywać ich sens fizyczny. Można było jednak zaobserwować, że po zmianie rozpuszczalnika z HFIP na DCM podczas elektroprzędzenia mikrowłókien matrycy, zgodność z kinetyką zerowego rzędu była w tym przypadku o wiele niższa. Biorąc pod uwagę wartość współczynnika uwalniania z modelu Korsmeyera-Peppasa, stwierdzono, że znaczny wpływ na szybkość uwalniania SLM miała dyfuzja zgodna z prawami Ficka

($n < 0,5$). Wyjątek stanowiła włóknina PDLGA/Sil/5/D, która wykazywała największy stopień dopasowania do modelu Higuchiego. Jednak, wysoka wartość współczynnika R_{adj}^2 dla modelu odpowiadającego kinetyce pierwszego rzędu, Hixona-Corwella oraz Korsmeyera-Peppasa sugerowała, że na szybkość procesu wpływ w tym przypadku miała nie tylko dyfuzja niezgodna z prawami Ficka ($0,5 < n < 1,0$), ale również procesy erozyjne oraz gradient stężenia leku w układzie (Tabela 38).

15.2.7.2. Wyznaczanie profili uwalniania soli sodowej diklofenaku (DiNa)

Zgodnie z oczekiwaniami, ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie sól sodowa diklofenaku uwalniała się bardzo szybko. We wszystkich przypadkach, po 14 dniach z matrycy PDLGA uwolnione zostało co najmniej 90% wag. leku (Rys. 64). W tej fazie widać było wyraźne różnice pomiędzy szybkością uwalniania z poszczególnych próbek. Po 24 godzinach, niezmodyfikowana włóknina uwolniła $61 \pm 1\%$ DiNa ($30,62 \pm 0,73 \mu\text{g}/\text{mg}$), co stanowiło przedostatni wynik, jednak po 7 dniach uwolniona dawka leku była już najwyższa, wynosiła bowiem $95 \pm 2\%$ ($47,69 \pm 0,75 \mu\text{g}/\text{mg}$). 14 dnia uwolniono całość leku wprowadzonego do matrycy, czyli $50,18 \pm 0,25 \mu\text{g}/\text{mg}$.

Zastosowanie przeplotu z nanowłóknami ChronoSil w największym stopniu wpłynęło na proces uwalniania soli sodowej diklofenaku. Zamiast dwuetapowego profilu, charakterystycznego dla pozostałych materiałów, zaobserwowano uwalnianie trójetapowe. W czasie 24 godzin uwolniono $37 \pm 12\%$ ($18,57 \pm 5,90 \mu\text{g}/\text{mg}$) leku. Duże odchylenie standardowe sugerowało niestabilność procesu, wynikającą najprawdopodobniej z zaburzenia transportu wody w głąb materiału na skutek hydrofobizacji wywołanej obecnością nanowłókien ChronoSil. Następnie, uwalnianie DiNa miało charakter zbliżony do liniowego, jednak była to prosta o dużo mniejszym nachyleniu niż po pierwszym dniu eksperymentu. Po 7 dniach uwolniono $55 \pm 9\%$ ($28,12 \pm 4,59 \mu\text{g}/\text{mg}$), a po 14 dniach $95 \pm 1\%$ ($48,17 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{mg}$). Całość wprowadzonego DiNa uwolniła się po 21 dniach ($50,75 \pm 0,51 \mu\text{g}/\text{mg}$).



Rys. 64. Skumulowane uwalnianie soli sodowej diklofenaku z włóknin PDLGA/PCU o początkowym stężeniu leku w matrycy wynoszącym 5%. Mikrowłókna matrycy otrzymano z roztworów w DCM ($\bar{x} \pm \text{SD}$; $N=3$)

Modyfikacja włókniny PDLGA za pomocą higroskopijnego HydroThane spowodowała, że w czasie 24 godzin uwolniła się największa ilość leku, wynosząca $77\pm 3\%$ ($38,85\pm 5,90 \mu\text{g}/\text{mg}$). Tendencja ta utrzymywała się jeszcze do 3 dnia, kiedy to nastąpiło spowolnienie procesu. Po 7 dniach uwolnione zostało $89\pm 2\%$ ($45,04\pm 4,59 \mu\text{g}/\text{mg}$) DiNa, co było wartością porównywalną z włókniną PDLGA/5/D. Tak jak w przypadku materiału odniesienia, proces zakończył się po 14 dniach, kiedy to nie stwierdzono obecności leku w matrycy. Całkowita ilość DiNa uwolnionego do otoczenia wyniosła $50,77\pm 0,11 \mu\text{g}/\text{mg}$.

Dodatkowo, zbadano wpływ poliuretanu ChronoFlex, wykazującego najwyższą hydrofilowość, na uwalnianie soli sodowej diklofenaku. Wbrew oczekiwaniom, nie spowodował on przyspieszenia procesu, chociaż w początkowej fazie charakteryzował się profilem uwalniania zbliżonym do włókniny referencyjnej. Po 24 godzinach uwolnione zostało $64\pm 4\%$ leku ($32,56\pm 1,81 \mu\text{g}/\text{mg}$), jednak od 3 dnia różnice stawały się coraz bardziej widoczne, a uwalnianie z próbek PDLGA/Flex/5/D zwolniło. Po 7 dniach uzyskano $82\pm 3\%$ ($41,86\pm 1,35 \mu\text{g}/\text{mg}$). Gęsta sieć nanowłókien ChronoFlex, pomimo hydrofilowości, prawdopodobnie utrudniła dyfuzję leku z wnętrza materiału, ponieważ ostatnie 10 % wag. DiNa uwalniało się najdłużej – od 14 dnia, do dnia 42. Ostatecznie po tym czasie cały lek został przetransportowany do roztworu PBS ($51,10\pm 0,20 \mu\text{g}/\text{mg}$).

Tabela 39. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji R_{adj}^2 przedstawiające dopasowanie wybranych modeli kinetyki uwalniania leków do profili uwalniania soli sodowej diklofenaku oraz stałe szybkości uwalniania (k)

Włóknina	Modele kinetyki uwalniania leku				
	0 rzędu	1 rzędu	Higuchiego	Hixona-Corwella	Korsmeyera-Peppasa
	$R_{adj}^2 (k_0)$	$R_{adj}^2 (k_1)$	$R_{adj}^2 (k_H)$	$R_{adj}^2 (k_{HC})$	$R_{adj}^2 (n; k_{KP})$
PDLGA/5/D	0,4374 (3,439)	0,9644 (0,729)	0,7294 (20,137)	0,7858 (0,066)	0,9617 (0,31; 54,204)
PDLGA/Sil/5/D	0,8557 (4,133)	0,8395 (0,181)	0,9447 (20,681)	0,9093 (0,033)	0,9715 (0,21; 34,711)
PDLGA/Thane/5/D	0,2972 (2,700)	0,8493 (2,173)	0,5677 (16,287)	0,5602 (0,061)	0,9875 (0,13; 71,394)
PDLGA/Flex/5/D	0,3604 (2,633)	0,7079 (0,834)	0,6345 (15,560)	0,6079 (0,057)	0,9968 (0,15; 61,915)

k_0 – stała szybkości uwalniania zerowego rzędu; k_1 – stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu; k_H – stała szybkości uwalniania Higuchiego; k_{HC} – stała szybkości uwalniania Hixona-Corwella; k_{KP} – stała szybkości uwalniania Korsmeyera-Peppasa; n – współczynnik uwalniania Korsmeyera-Peppasa;

Wszystkie profile uwalniania soli sodowej diklofenaku wykazywały najlepsze dopasowanie do modelu Korsmeyera-Peppasa (Tabela 39). Wartości współczynnika $n < 0,5$ wskazywały na to, że proces uwalniania był limitowany szybkością dyfuzji zgodną z prawami Ficka. Lek wykazywał bardzo dobrą rozpuszczalność, a samo uwalnianie trwało na tyle krótko, że szybkość rozpuszczania oraz erozja miały w tym przypadku pomijalne znaczenie. Najwyższą stałą szybkości uwalniania k_{KP} wyznaczono dla włókniny zawierającej nanowłókna HydroThane, która charakteryzowała się najszybszym uwalnianiem leku w czasie pierwszej doby. Dodatkowo, można było zauważyć, że

uwalnianie z niezmodyfikowanej włókniny odniesienia było również zgodne z kinetyką pierwszego rzędu (R_{adj}^2 : 0,9644), co świadczyło o zależności szybkości procesu od czasu oraz gradientu stężeń pomiędzy warstwą statyczną cieczy bezpośrednio przy powierzchni włókien PDLGA a otaczającym medium.

Uzyskane w niniejszym eksperymencie wyniki nie były tak zbliżone do siebie jak w przypadku włókien, w których nośnik leku otrzymano z roztworów w HFIP (Rozdział 15.1.7.2). Zastosowanie DCM jako rozpuszczalnika w procesie elektroprzędzenia roztworów kopoliestru, dzięki rozwinięciu powierzchni właściwej włókien matrycy przyspieszyło uwalnianie DiNa w czasie 24 godzin, jednak nieoczekiwanie w dalszej części eksperymentu uległo ono spowolnieniu względem PDLGA przędzonego z roztworów w HFIP. W przypadku próbek PDLGA/5/D i PDLGA/Thane/5/D było ono niewielkie, jednak dla PDLGA/Sil/5/D zaobserwowano wyraźny spadek szybkości uwalniania DiNa aż do 14 dnia. Wynikało to prawdopodobnie z wydłużenia drogi dyfuzji leku ze względu na uzyskanie większych rozmiarów mikrowłókien PDLGA. Włókniny, w których porowatość matrycy była większa nieco szybciej uwalniały resztkowe ilości leku pozostające w materiale, ze względu na większą powierzchnię kontaktu z otaczającym medium degradacyjnym.

15.2.8. Analiza zmian właściwości mechanicznych włókien PDLGA/PCU w czasie inkubacji

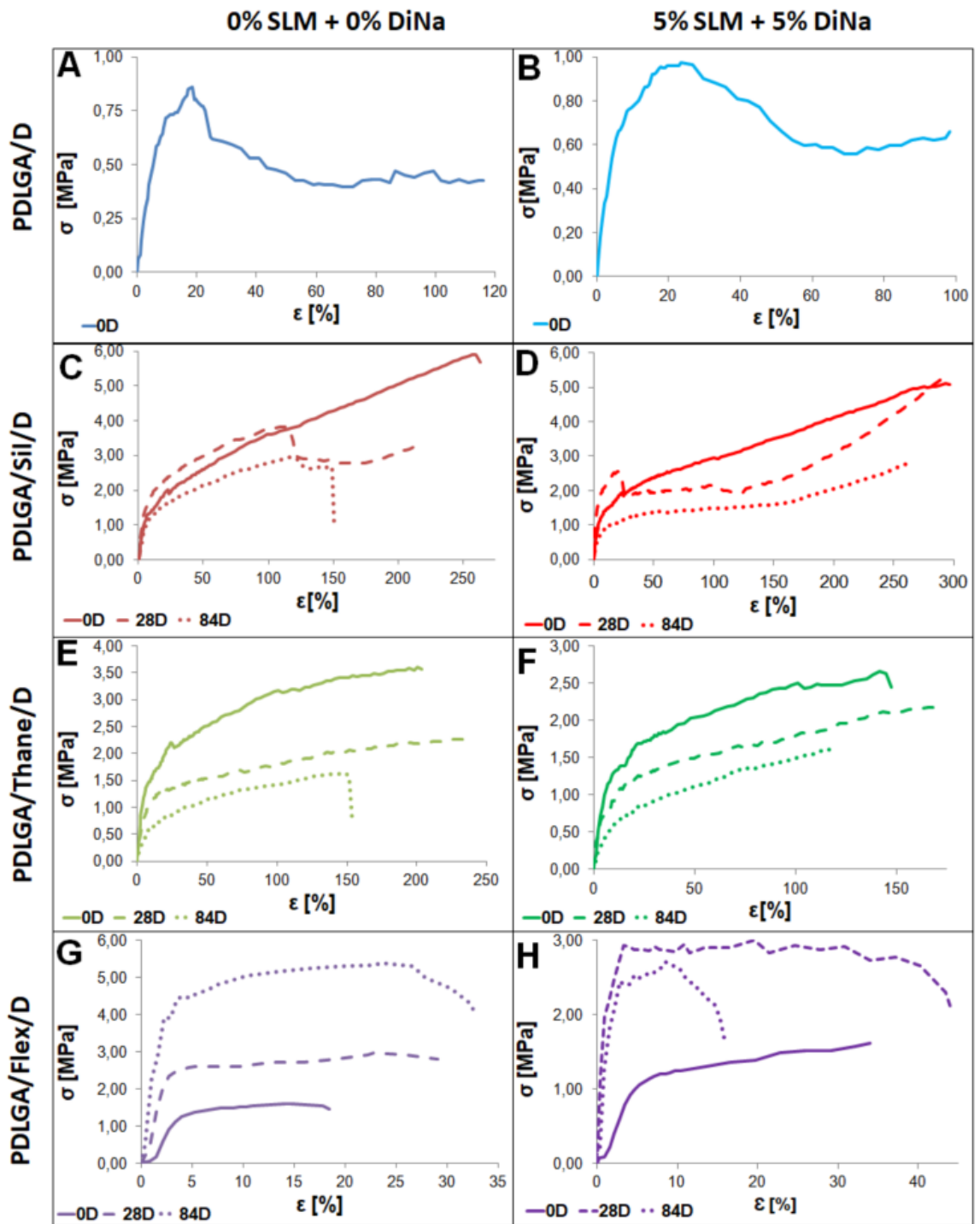
W celu zbadania zmian właściwości mechanicznych włókien PDLGA/PCU, w których mikrowłókna kopoliestru otrzymano z roztworów w DCM, przeprowadzono statyczną próbę rozciągania. Na podstawie analizy krzywych rozciągania, wyznaczono parametry tj. wytrzymałość na rozciąganie σ_{max} [MPa], naprężenie i odkształcenie na granicy sprężystości (plastyczności) (σ_y [MPa] i ϵ_y [%]) oraz wartości naprężenia przy odkształceniach wynoszących 25%, 50% i 100% (Tabela 40).

W przypadku włókniny referencyjnej, zaobserwowano, że ze względu na wzrost porowatości mikrowłókien PDLGA, właściwości mechaniczne uległy pogorszeniu w porównaniu do wyników uzyskanych w *Eksperymentie 1* (Rozdział 15.1.8). Wytrzymałość na rozciąganie zmniejszyła się o 28% względem PDLGA/0/H, do wartości $0,86 \pm 0,12$ MPa, a w przypadku naprężenia na granicy sprężystości różnica była jeszcze większa, chociaż zaobserwowano też ponad dwukrotne wydłużenie odcinka odkształceń sprężystych. Po wprowadzeniu leków właściwości mechaniczne uległy pewnej poprawie (większe naprężenia w materiale, szczególnie w zakresie odkształceń plastycznych), jednak zdolność od maksymalnego odkształcania uległa zmniejszeniu (Rys. 65A i B). Ponownie, ze względu na zbyt dużą kruchość próbek, a także silny skurcz w czasie inkubacji w 37 °C, przeprowadzenie pomiarów po 28 i 84 dniach nie było możliwe.

Wprowadzenie przeplotu z nanowłóknami PCU spowodowało poprawę właściwości mechanicznych włókien. W próbce PDLGA/Sil/0/D nie zaobserwowano granicy sprężystości, wystąpił za to wzrost elastyczności oraz pojawiła się tendencja do orientacji włókien (Rys. 65C). Z tego względu, uzyskana wytrzymałość na rozciąganie była najwyższa spośród wszystkich wariantów modyfikacji włókniny PDLGA, jednak maksymalnemu naprężeniu $5,75 \pm 0,23$ MPa odpowiadało odkształcenie $245,73 \pm 15,95$ %, co z punktu widzenia aplikacyjnego nie byłoby użyteczne, ponieważ opracowany materiał w założeniu swojego działania, miałby za zadanie wzmacnianie tkanek miękkich, które odkształcają się w mniejszym zakresie. Niemniej jednak, do 100% odkształcenia nastąpiła

znaczna poprawa właściwości mechanicznych włókniny, względem materiału odniesienia (Tabela 40). Po 28 dniach zaobserwowano, że elastyczność próbek zawierających nanowłókna ChronoSil spadła, o 20%, przy niewielkim wzroście wartości naprężeń (do odkształcenia wynoszącego o około 120%). Po 84 dniach degradacji oba parametry uległy zmniejszeniu. W przypadku włókniny PDLGA/Thane/0/D zaobserwowano takie same tendencje, przy czym wpływ degradacji na spadek naprężeń był większy, a zdolność do odkształcania mniejsza (Rys. 65E). W obu przypadkach wprowadzenie substancji leczniczych dało efekt odwrotny niż dla włókniny odniesienia. Zaobserwowano spadek wytrzymałości na rozciąganie oraz naprężeń w zakresie do 100% odkształcenia. W przypadku włókniny zawierającej ChronoSil różnice właściwości mechanicznych pomiędzy próbkami zawierającymi i niezawierającymi substancji aktywnych, przed inkubacją były mniejsze niż dla wariantu modyfikacji za pomocą nanowłókien HydroThane, jednak w czasie degradacji hydrolytycznej zaobserwowano odwrotną tendencję (Rys. 65D i F). Spadkowi wytrzymałości na rozciąganie nie towarzyszyło jednak tak duże zmniejszenie elastyczności, jak w przypadku materiałów bez leków. Porównując oba typy włókien do otrzymanych w *Eksperymencie 1*, stwierdzono, że wykazywały one większą stabilność właściwości mechanicznych i w mniejszym stopniu utraciły swoją elastyczność. Wpływ leków był w tym przypadku mniej widoczny, ze względu na to, że uwalniały się szybciej (szczególnie sirolimus), a ich stężenie wynosiło jedynie po 5% wag. Nie zaobserwowano również granicy sprężystości, co świadczyło o tym, że porowate, bardziej elastyczne, ale mniej wytrzymałe włókna PDLGA odgrywały mniejszą rolę w przenoszeniu naprężeń.

W *Eksperymencie 2* wprowadzono również modyfikator PCU w postaci nanowłókien ChronoFlex, o wyższej wytrzymałości mechanicznej oraz o T_g powyżej temperatury, w której dokonywano pomiaru, wynoszącej 37 °C. Z tego względu, włókniny do których został wprowadzony, wykazywały wyraźną granicę sprężystości. Nie spowodowało to jednak poprawy właściwości mechanicznych próbek przed degradacją w założonym stopniu. Chociaż w materiale PDLGA/Flex/0/D zarówno wytrzymałość na rozciąganie jak i naprężenie na granicy sprężystości wzrosły około dwukrotnie względem niezmodyfikowanej włókniny PDLGA, to jednak próbki ulegały zerwaniu nie osiągając 20% odkształcenia. Uzyskane wyniki były gorsze niż w przypadku modyfikacji przy użyciu elastomerów ChronoSil i HydroThane, które wykazywały niższą wytrzymałość mechaniczną niż ChronoFlex (Tabela 40). Zgodnie z obserwacjami dokonanymi na podstawie eksperymentu, w którym inkubowano włókniny wykonane wyłącznie z PCU (Rys. 29), właściwości mechaniczne PDLGA/Flex/0/D powinny ulec znacznej poprawie po inkubacji w wodnym roztworze PBS w 37 °C. Taki wynik uzyskano po 28 dniach, kiedy to wytrzymałość na rozciąganie włókien wzrosła z $1,57 \pm 0,05$ MPa do $2,97 \pm 0,50$ MPa, a po 84 dniach wynosiła $4,78 \pm 0,86$ MPa, co było najwyższą wartością spośród testowanych próbek. Ponadto, materiał zawierający ChronoFlex wykazywał dużą odporność na rozciąganie już przy bardzo małych odkształceniach, co potencjalnie mogłoby być korzystne w przypadku zastosowania we wzmacnianiu tkanek miękkich. Wprowadzenie leków, do 28 dnia nie spowodowało większych zmian wytrzymałości mechanicznej, za to w niewielkim stopniu poprawiło elastyczność włókniny (ϵ_{max} $44,41 \pm 3,79\%$) (Rys. 65H). Jednak, po 84 dniach, ze względu na degradację nastąpił spadek naprężenia w materiale, a zdolność do maksymalnego odkształcania wróciła do poziomu około 20%.



Rys. 65. Przykładowe krzywe zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ) obrazujące przebieg zmian właściwości mechanicznych w czasie inkubacji włókien, wyznaczone w statycznej próbie rozciągania

Tabela 40. Zmiany właściwości mechanicznych włókien zmierzone w czasie inkubacji ($\bar{x}\pm SD$; N=3)

Etap degradacji	Parametr	Oznaczenie włókniny									
		PDLGA/0/D	PDLGA/5/D	PDLGA/SII/0/D	PDLGA/SII/5/D	PDLGA/Thane/0/D	PDLGA/Thane/5/D	PDLGA/Flex/0/D	PDLGA/Flex/5/D		
Dzień 0	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	0,63±0,07	0,97±0,10	1,99±0,17	1,86±0,13	2,20±0,17	1,71±0,16	zerwanie	1,50±0,14		
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	0,45±0,06	0,69±0,11	2,61±0,15	2,37±0,24	2,50±0,16	2,03±0,18	zerwanie	zerwanie		
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	0,45±0,09	0,64±0,08	3,61±0,21	2,94±0,27	3,17±0,23	2,49±0,11	zerwanie	zerwanie		
	σ_{max} [MPa]	0,86±0,12	0,97±0,13	5,75±0,23	5,10±0,18	3,48±0,61	2,65±0,48	1,57±0,05	1,61±0,09		
	$(\epsilon_{max}, [\%])$	(17,23±1,32)	(26,13±1,77)	(245,73±15,95)	(293,46±6,11)	(191,31±21,10)	(144,28±7,99)	(15,01±2,46)	(34,08±3,62)		
	σ_y [MPa]	0,72±0,10	0,86±0,14	Nie	Nie	Nie zaobserwowano	Nie	1,56±0,06	1,21±0,29		
Dzień 28	$(\epsilon_y, [\%])$	(9,73±0,49)	(13,41±1,55)	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	(13,76±1,28)	(7,82±1,53)		
	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	2,42±0,16	1,90±0,10	1,34±0,14	1,27±0,12	2,95±0,19	2,91±0,15		
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	3,00±0,20	1,93±0,14	1,53±0,15	1,49±0,09	zerwanie	zerwanie		
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	3,77±0,19	2,17±0,14	1,81±0,11	1,80±0,14	zerwanie	zerwanie		
	σ_{max} [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	4,17±0,46	5,43±0,88	2,92±0,84	2,18±0,53	2,97±0,50	3,02±0,43		
	$(\epsilon_{max}, [\%])$	(116,44±3,09)	(297,50±6,45)	(116,44±3,09)	(324,94±40,94)	(171,30±5,88)	(171,30±5,88)	(22,78±1,32)	(19,83±1,04)		
Dzień 84	σ_y [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Nie	2,55±0,24	Nie zaobserwowano	Nie	2,57±0,63	2,93±0,71		
	$(\epsilon_y, [\%])$	(9,73±0,49)	(13,41±1,55)	zaobserwowano	(19,64±2,17)	Nie zaobserwowano	zaobserwowano	(4,66±0,71)	(3,38±0,08)		
	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	1,69±0,12	1,16±0,09	0,86±0,08	0,85±0,06	4,08±0,30	zerwanie		
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	2,15±0,18	1,38±0,12	1,13±0,10	1,10±0,10	zerwanie	zerwanie		
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	2,79±0,22	1,48±0,09	1,43±0,13	1,49±0,15	zerwanie	zerwanie		
	σ_{max} [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	3,35±0,57	2,85±4,99	1,59±0,06	1,61±0,20	4,78±0,86	2,71±0,39		
$\sigma(\epsilon 25\%)/(\epsilon 50\%)/(\epsilon 100\%)$ – naprężenie przy odkształceniu 25%/50%/100%; σ_{max} - wytrzymałość na granicy sprężystości naprężenia; σ_y – naprężenie na granicy sprężystości; ϵ_y odkształcenie na granicy sprężystości	$(\epsilon_{max}, [\%])$	(128,71±14,50)	(128,71±14,50)	(266,54±13,20)	(266,54±13,20)	(167±1826,52)	(115,11±3,99)	(22,45±1,49)	(8,63±0,80)		
	σ_y [MPa]	Brak pomiaru**	Brak pomiaru**	Nie	Nie	Nie zaobserwowano	Nie	4,08±0,60	2,46±0,41		
	$(\epsilon_y, [\%])$	(9,73±0,49)	(13,41±1,55)	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	(3,18±1,33)	(2,80±0,11)		

$\sigma(\epsilon 25\%)/(\epsilon 50\%)/(\epsilon 100\%)$ – naprężenie przy odkształceniu 25%/50%/100%; σ_{max} - wytrzymałość na rozciąganie; $\epsilon_{\sigma_{max}}$ – odkształcenie odpowiadające maksymalnej wartości naprężenia; σ_y – naprężenie na granicy sprężystości; ϵ_y odkształcenie na granicy sprężystości
 Brak zerwania próbki w zakresie pomiarowym ograniczonym wymiarami komory środowiskowej. *Próbki zbyt kruche na skutek procesu degradacji – uległy uszkodzeniu podczas montażu w uchwytych maszyny wytrzymałościowej.

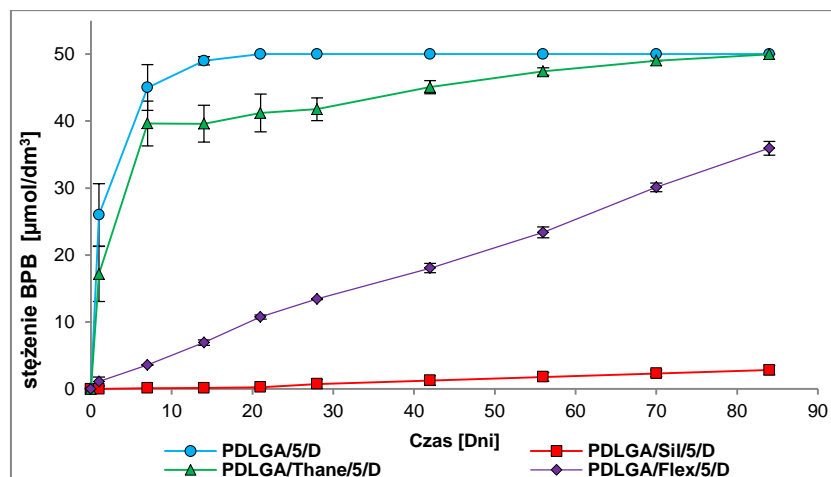
Uzyskanie porowatej struktury włókien PDLGA spowodowało spadek ich sztywności. Z tego względu na krzywych zależności naprężenia od odkształcenia, wyznaczonych dla włókien zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien PCU nie obserwowano granicy sprężystości. Względem *Eksperymentu 1*, zauważalne wzrosła elastyczność po degradacji materiałów zawierających ChronoSil, zaś w przypadku próbek, do których wprowadzono HydroThane uzyskano mniejszą zdolność do odkształceń. W obu przypadkach wartości naprężeń były zdecydowanie wyższe, co wynikało prawdopodobnie z uzyskania włókien PDLGA o większych średnicach, a ich mniejsza sztywność pozwalała na silniejszą orientację materiału w kierunku rozciągania. Wprowadzenie nanowłókien ChronoFlex pozwoliło na uzyskanie materiału o najlepszych właściwościach mechanicznych, które ze względu na krystalizację tego polimeru (Rys. 30) i niewielki skurcz, ulegały poprawie w czasie inkubacji.

15.2.9. Badanie przenikania barwnika przez wewnętrzną membranę PCU włókien

Wykorzystując metodę opisaną w Rozdziale 11.12, badano proces przenikania modelowego barwnika – błękitu bromofenolowego (BPB) przez włókniny zawierające przeplot mikrowłókien PDLGA i nanowłókien PCU o różnej hydrofilowości. Na etapie wytwarzania, za pomocą elektrorozpylenia wytworzono litą, poliuretanową membranę w rdzeniu każdej z nich. Założeniem jej działania, było ograniczenie transportu leków z jednej strony materiału na drugą. Podczas eksperymentu obserwowano, jak szybko dojdzie do wyrównania stężeń roztworu BPB pomiędzy dwoma naczyniami, oddzielonymi włókniną, z których jedno zawierało roztwór barwnika i PBS, a drugie wodny roztwór buforu PBS o pH 7,4 (Rys. 66). W celu oceny skuteczności działania włókien wyznaczono zmiany współczynnika retencji (R), które umożliwiły porównanie stopnia zatrzymania barwnika przez membrany PCU na każdym z etapów inkubacji (Tabela 41).

Zaobserwowano, że włóknina PDLGA ze względu na bardzo porowatą strukturę o niewielkiej gęstości objętościowej oraz silną chłonność wody (Rys. 57), a także brak wewnętrznej membrany, bardzo słabo ograniczała przenikanie barwnika. Wyrównanie stężeń pomiędzy komorą zawierającą roztwór BPB, a komorą do której wprowadzono czysty bufor PBS nastąpiło po około 14 dniach, chociaż, po tygodniu wynosiło już $45,00 \pm 3,41 \mu\text{mol/l}$ (wyrównanie miało miejsce przy $50 \mu\text{mol/l}$). Wartość współczynnika retencji uległa bardzo szybkiemu zmniejszeniu. Po 1 dniu wynosiła 0,65 a po 7 dniach 0,18.

Włóknina, do której wprowadzono modyfikator HydroThane, w nieco większym stopniu ograniczyła transport BPB, chociaż ze względu na higroskopijność PCU i chłonność próbki, różnica w stosunku do materiału odniesienia była niewielka. Wyrównanie stężeń nastąpiło dopiero 84 dniach ($49,98 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$). Zaobserwowano jednak zmianę szybkości transportu barwnika w czasie. Przez pierwsze 7 dni zachodził szybciej, o czym świadczył znaczny przyrost stężenia BPB w komorze pomiarowej, wynoszący $39,64 \pm 4,12 \mu\text{mol/l}$ oraz duży spadek wartości współczynnika retencji z 0,79 po 1 dniu do 0,34. Następnie, w drugim etapie proces przebiegał wolniej. Ze względu na chłonność włókniny oraz higroskopijność HydroThane, zaobserwowano silne zabarwienie włókniny po kontakcie z roztworem barwnika (Rys. 67).



Rys. 66. Zależność stężenia roztworu barwnika BPB w komorze pomiarowej od czasu ($\bar{x} \pm SD$; N=2)

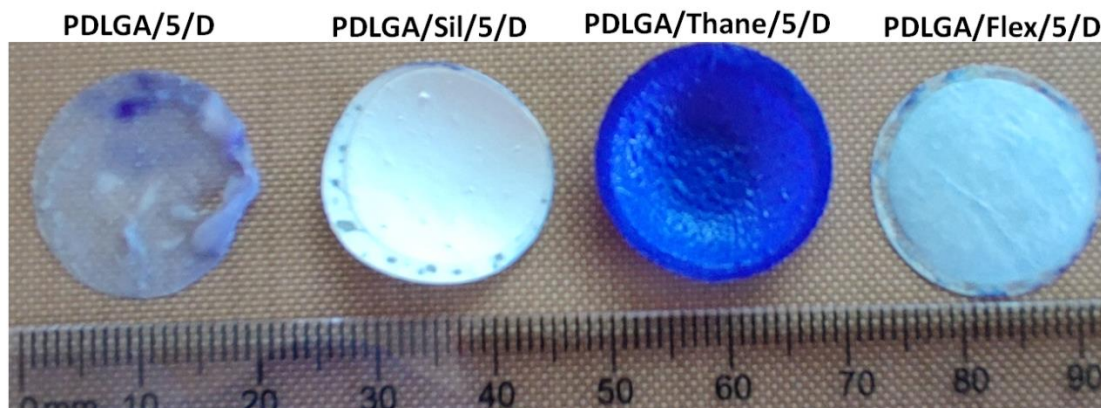
Wprowadzenie modyfikatora w postaci poliuretanu ChronoFlex spowodowało znaczne ograniczenie transportu barwnika. Wyrównanie stężeń nie nastąpiło w czasie trwania eksperymentu. Zawartość BPB po 84 dniach w permeacie wynosiła $35,94 \pm 1,02 \mu\text{mol/l}$, a współczynnik retencji zmniejszył się z 0,99 po 1 dniu do wartości 0,44. Zmiany stężenia barwnika w komorze pomiarowej miały charakter liniowy. Stwierdzono, że wynik ten uzyskano poprzez nałożenie się dwóch efektów. Pierwszym z nich była stosunkowo wysoka hydrofilowość i zwilżalność powierzchni poliuretanu, co umożliwiło dyfuzję BPB. Z drugiej strony, zarówno matryca PDLGA jak i modyfikator ChronoFlex charakteryzowały się temperaturą zeszczenia wyższą niż temperatura inkubacji włókien, stąd oba polimery znajdowały się w stanie szklistym, charakteryzującym się większą gęstością. Ze względu na opory dyfuzji przez membranę, miał miejsce kontrolowany transport barwnika z roztworu nadawy do permeatu.

Tabela 41. Zmiany współczynnika retencji (R) włókien, względem BPB w czasie inkubacji, wyznaczone na podstawie średnich stężeń barwnika w nadawie i permeacie

Czas [Dni]	R [-] PDLGA	R [-] PDLGA/Sil/5/D	R [-] PDLGA/Thane/5/D	R [-] PDLGA/Flex/5/D
1	0,65	1,00	0,79	0,99
7	0,18	1,00	0,34	0,96
14	0,04	1,00	0,34	0,93
21	0,00	1,00	0,30	0,88
28	0,00	0,99	0,28	0,84
42	0,00	0,99	0,18	0,78
56	0,00	0,98	0,10	0,69
70	0,00	0,98	0,04	0,57
84	0,00	0,97	0,00	0,44

Włókna zmodyfikowana za pomocą ChronoSilu bardzo mocno ograniczyła przenikanie barwnika na drugą stronę materiału. Stężenie BPB w komorze pomiarowej miało wartość poniżej $1 \mu\text{mol/l}$ przez 28 dni, a ostatecznie wyniosło $2,82 \pm 0,69 \mu\text{mol/l}$. Współczynnik retencji nie ulegał większym zmianom, dlatego możliwe było wyciągnięcie jego średniej wartości dla całego

eksperymentu trwającego 84 dni. Wynosił on $0,99 \pm 0,01$ co świadczyło o niemal całkowitym zablokowaniu transportu BPB, ze względu na hydrofobowe właściwości ChronoSilu, z czego wynikała stosunkowo słaba chłonność i zwilżalność włókniny. Obrazuje to brak zabarwienia próbki po kontakcie z roztworem barwnika (Rys. 67).



Rys. 67. Przykładowe zdjęcie włókien, wykonane po 42 dniach inkubacji w kontakcie z roztworem barwnika BPB

Eksperyment wykazał, że możliwy jest wpływ na proces dyfuzji leków w obrębie struktury włókniny. Stosując membranę wykonaną z poli(węglano uretanów) o różnych właściwościach, uzyskano ograniczenie przenikania modelowego barwnika przez wewnętrzną strukturę materiału, także w kontrolowany sposób, jak to miało miejsce w przypadku PDLGA/Flex/5/D, jak również niemal całkowite uniemożliwienie procesów transportu, zaobserwowane we włókninie PDLGA/Sil/5/D. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że stosując hydrofobowy modyfikator możliwe jest uzyskanie kierunkowego uwalniania leków, co w przypadku wykorzystywania sirolimusu zwiększa bezpieczeństwo potencjalnego stosowania włókien w leczeniu przepuklin.

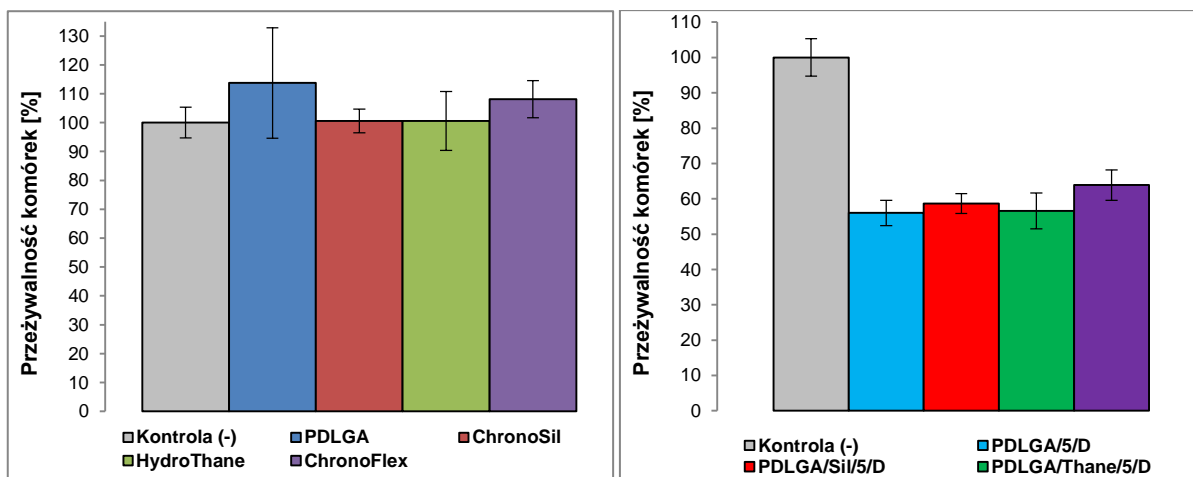
15.2.10. Badania włókien PDLGA/PCU z wykorzystaniem linii komórkowej fibroblastów

Eksperymenty na fibroblastach przeprowadzono w celu oceny wpływu sirolimusu oraz soli sodowej diklofenaku na cytotoksyczność oraz adhezję komórek na powierzchni włókien PDLGA/PCU otrzymanych metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia, w których mikrowłókna nośnika leków zostały wytworzone z roztworów w DCM.

15.2.10.1. Cytotoksyczność *in vitro*

Ocenę cytotoksyczności przeprowadzono na włókninach wytworzonych metodą klasycznego elektroprzędzenia z polimerów wyjściowych: PDLGA, ChronoSilu, HydroThane oraz ChronoFlexu, a także na elektroprzędzonych dwustrumieniowo materiałach składających się z przeplotu kopoliestrowych mikrowłókien zawierających leki oraz nanowłókien modyfikatora PCU. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 68.

Przeżywalność komórek w obecności włókniny PDLGA otrzymanej z DCM była niemal taka sama jak w *Eksperymentcie 1* (Rozdział 15.1.9.1.) i wynosiła $114 \pm 19\%$, zaś w włóknina wytworzona z ChronoFlexu wykazywała najmniejszą cytotoksyczność spośród poli(węglano uretanów).



Rys. 68. Przeżywalność komórek wyznaczona w materiałach wyjściowych (z lewej) oraz we włókninach zawierających po 5% SLM oraz DiNa (z prawej) ($\bar{x} \pm SD$; N=4)

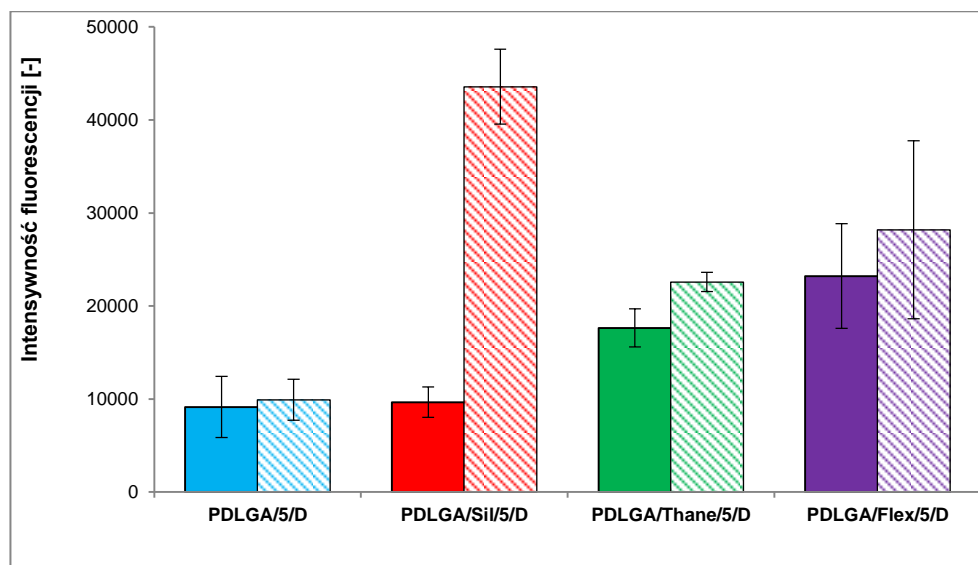
Ze względu na szybsze uwalnianie sirolimusu, w stosunku do wyników uzyskanych w *Eksperymentie 1* nastąpiło zmniejszenie przeżywalności fibroblastów w kontakcie z materiałami zawierającymi substancje aktywne. Rezultaty w tym przypadku, ponownie nie były zgodne z profilami uwalniania SLM (Rys. 63). Zarejestrowano wpływ leku na przeżywalność komórek, jednak nie obserwowano efektu jego dawki. W przypadku włókniny PDLGA/5/D przeżywalność komórek wynosiła $56 \pm 4\%$. Po modyfikacji za pomocą nanowłókien ChronoSil oraz HydroThane nieznacznie wzrosła, do odpowiednio $59 \pm 3\%$ i $57 \pm 5\%$, jednak była to zmiana niewielka w porównaniu do różnic w dawce uwolnionego po 3 dniach SLM. W przypadku materiału PDLGA/Flex/5/D zaobserwowano pewien spadek cytotoksyczności. Przeżywalność komórek w obecności tej włókniny wynosiła $64 \pm 4\%$.

15.2.10.2. Adhezja fibroblastów

W eksperymencie badano wpływ wzrostu rozmiarów oraz porowatości mikrowłókien PDLGA, a także przyspieszenia uwalniania leków, na adhezję komórek na powierzchni otrzymanych włókien PDLGA/PCU. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 69.

Podobnie jak w *Eksperymentie 1*, zaobserwowano, że w zależności od rodzaju substancji aktywnej zawartej we włóknach PDLGA oraz morfologii i hydrofilowości powierzchni, zdolność do adhezji fibroblastów na powierzchni otrzymanych włókien różniła się od siebie. Ponownie, w każdym przypadku intensywność fluorescencji (IF) była wyższa dla strony materiału zawierającej sól sodową diklofenaku. Włóknina PDLGA/5/D wykazywała znacznie mniejsze różnice w zdolności do adhezji komórek, niż w przypadku PDLGA/5/H, co mogło wynikać z mniejszej gęstości objętościowej włókniny, umożliwiającej dyfuzję działającego antyproliferacyjnie SLM wewnątrz struktury do powierzchni, z której uwalniany był DiNa. Ponadto, szybko pojawiające się uszczelnienie powierzchni włókniny, w wyniku którego zmniejszała się powierzchnia właściwa, mogło utrudnić adhezję komórek. W przypadku włókien zmodyfikowanych za pomocą PCU różnice adhezji fibroblastów pomiędzy poszczególnymi stronami materiału były większe. Zaobserwowano, że dla powierzchni zawierającej SLM, intensywność fluorescencji rosła wraz ze wzrostem hydrofilowości modyfikatora PCU, pomimo tego, że szybkość uwalniania leku również rosła w tym szeregu (Rys. 63). W przypadku powierzchni

uwalniającej DiNa zaobserwowano zaś tendencję odpowiadającą zdolności do absorbowania wody przez włókninę (Rys. 57), co jest kolejnym argumentem popierającym stwierdzenie dotyczące dyfuzji wewnętrznej SLM do powierzchni uwalniającej DiNa. W tym przypadku, najbardziej hydrofobowa wewnętrzna membrana wytworzona z ChronoSilu w największym stopniu utrudniła transport rapamycyny przez strukturę włókniny, co potwierdzały wyniki eksperymentu dotyczącego dyfuzji modelowego barwnika (Rozdział 15.2.9), a także IF wynosząca 43570 ± 4031 . Dodatkowo, wprowadzenie nanowłókien PCU w pewnym stopniu zmniejszało skurcz i zapadanie się struktury, co mogło sprzyjać zasiedlaniu powierzchni przez komórki.



Rys. 69. Adhezja fibroblastów na powierzchni włóknin zawierających sirolimus (pola pełne) oraz sól sodową diklofenaku (pola kreskowane) ($\bar{x} \pm SD$; N=4)

Zwiększenie porowatości mikrowłókien PDLGA skutkujące szybszym uwalnianiem leków, a także hydrofilowość modyfikatorów PCU oraz rozmiary mikro- i nanowłókien obecnych w materiale, wpłynęły na adhezję fibroblastów. Zaobserwowano, że gradientowa struktura otrzymanych włóknin wraz z obecnością litej membrany w jej rdzeniu, mogły wpłynąć na transport cytotoksycznego sirolimusu i tym samym obniżyć proliferację komórek na powierzchni uwalniającej uprzednio sól sodową diklofenaku. W omawianym przypadku zarówno morfologia powierzchni, wewnętrzna struktura włókniny jak i szybkość uwalniania leków mogły mieć zbliżony wpływ na uzyskane rezultaty. Ze względu na skomplikowany układ oddziaływań na adhezję fibroblastów, prowadzone będą dalsze badania, mające na celu dogłębne poznanie czynników odpowiedzialnych za ten proces.

16. Badanie właściwości włókien PCLTMC:PCL/PCU

W tej części pracy, jako nośnik leku zastosowano mieszaninę kopolimeru poli(ϵ -kaprolakton-co-węglan trimetylenu) z homopolimerem poli(ϵ -kaprolaktonem) (PCLTMC:PCL) o stosunku wagowym 90:10%. Nowa matryca, w porównaniu do PDLGA charakteryzowała się większą hydrofobowością, wolniejszą degradacją oraz znacznie niższą temperaturą zeszklenia, przez co w temperaturze inkubacji znajdowała się w stanie lepkosprężystym. Celem *Eksperymentu 3* było, pokazanie uniwersalności przedstawionej metody kontrolowania profili uwalniania leków, za pomocą przepłotu z nanowłóknami poli(węglano uretanów) o różnej hydrofilowości. Z tego względu zastosowano matrycę PCLTMC:PCL różniącą się od PDLGA właściwościami fizycznymi, termicznymi oraz strukturą powierzchni.

16.1. Eksperyment 3 – badanie włókien PCLTMC:PCL, zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien ChronoSil, HydroThane oraz ChronoFlex.

Metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia otrzymano częściowo biodegradowalne włókniwy, składające się z mikrowłókien mieszanki PCLTMC:PCL, elektroprzędzonych z roztworów w DCM oraz oplatających je poliuretanowych modyfikatorów w formie nanowłókien ChronoSil, HydroThane i ChronoFlex. Do matrycy wprowadzono po 5% wag. sirolimusu (SLM) i soli sodowej diklofenaku (DiNa). W *Eksperymencie 3* oprócz uwalniania leków, zbadano również wpływ modyfikatorów PCU na szybkość degradacji hydrolitycznej matrycy PCLTMC:PCL, właściwości mechaniczne włókien, przenikanie modelowej substancji małowcząsteczkowej przez ich wewnętrzną strukturę, a także przeprowadzono badania biologiczne z wykorzystaniem linii komórkowej fibroblastów.

PCL wprowadzono do kopolimeru PCLTMC w celu wytworzenia pewnej zawartości fazy krystalicznej, mającej za zadanie stabilizację kształtu włókien w warunkach prowadzenia eksperymentu, przynajmniej w początkowym okresie inkubacji (a także w czasie suszenia próbek po elektroprzędzeniu). Zabieg ten bardziej szczegółowo opisano w Rozdziale 13.2. Wpływ dodatku PCL na niektóre właściwości PCLTMC, a także ich porównanie z PDLGA przedstawiono w Tabeli 42.

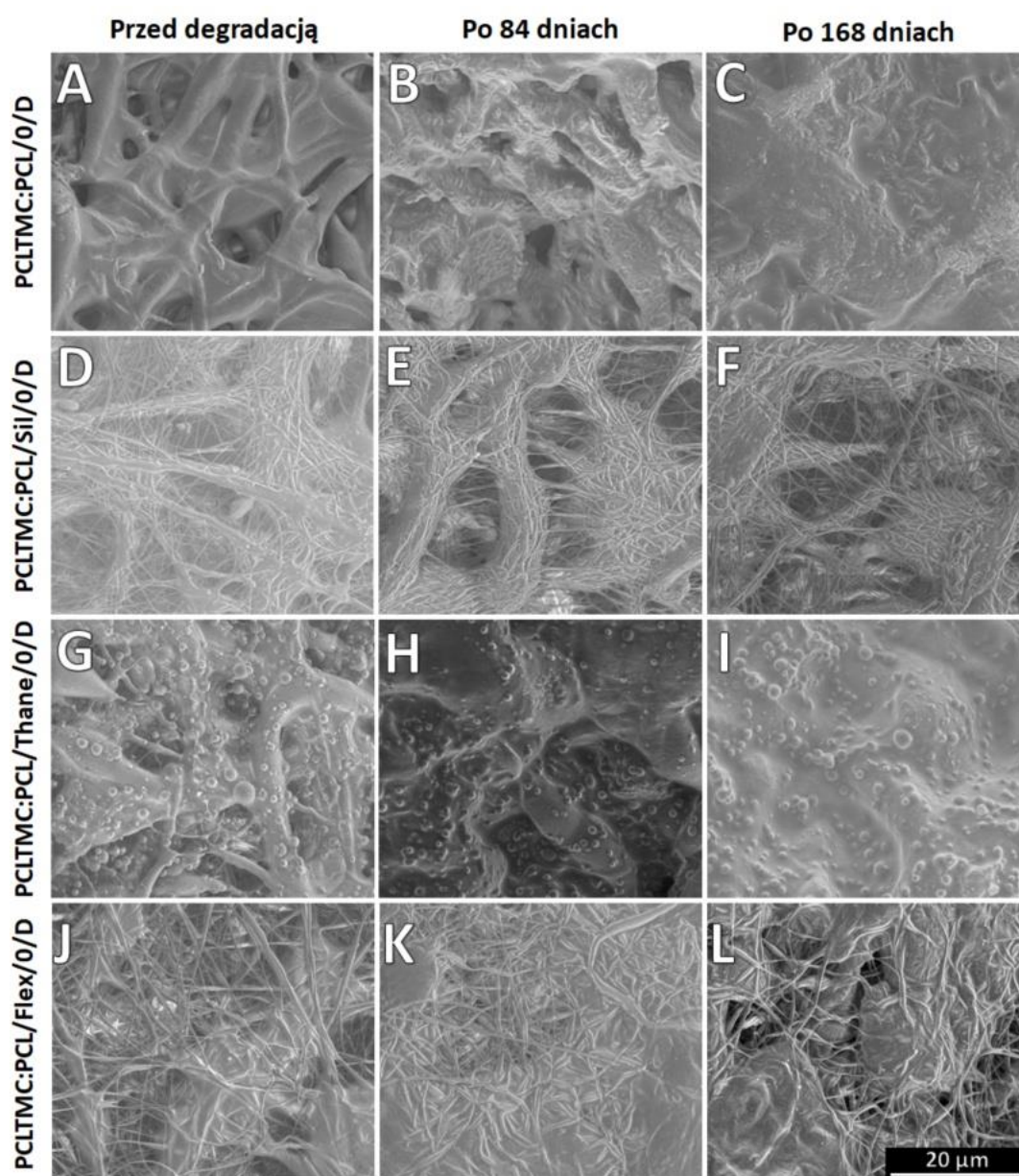
Tabela 42. Wpływ PCL na właściwości mieszanki PCLTMC:PCL oraz ich porównanie z PDLGA

Polimer	T _g [°C]	T _{kr} [°C]	Θ _c [°]
PCLTMC (40:60)	-38	Brak	91,1±1,2
PCL	-65	59	112,0±1,0
PCLTMC:PCL (90:10)	-42	56	99,±2,3
PDLGA	54	Brak	74,7±1,2

16.1.1. Analiza zmian morfologii powierzchni włókien

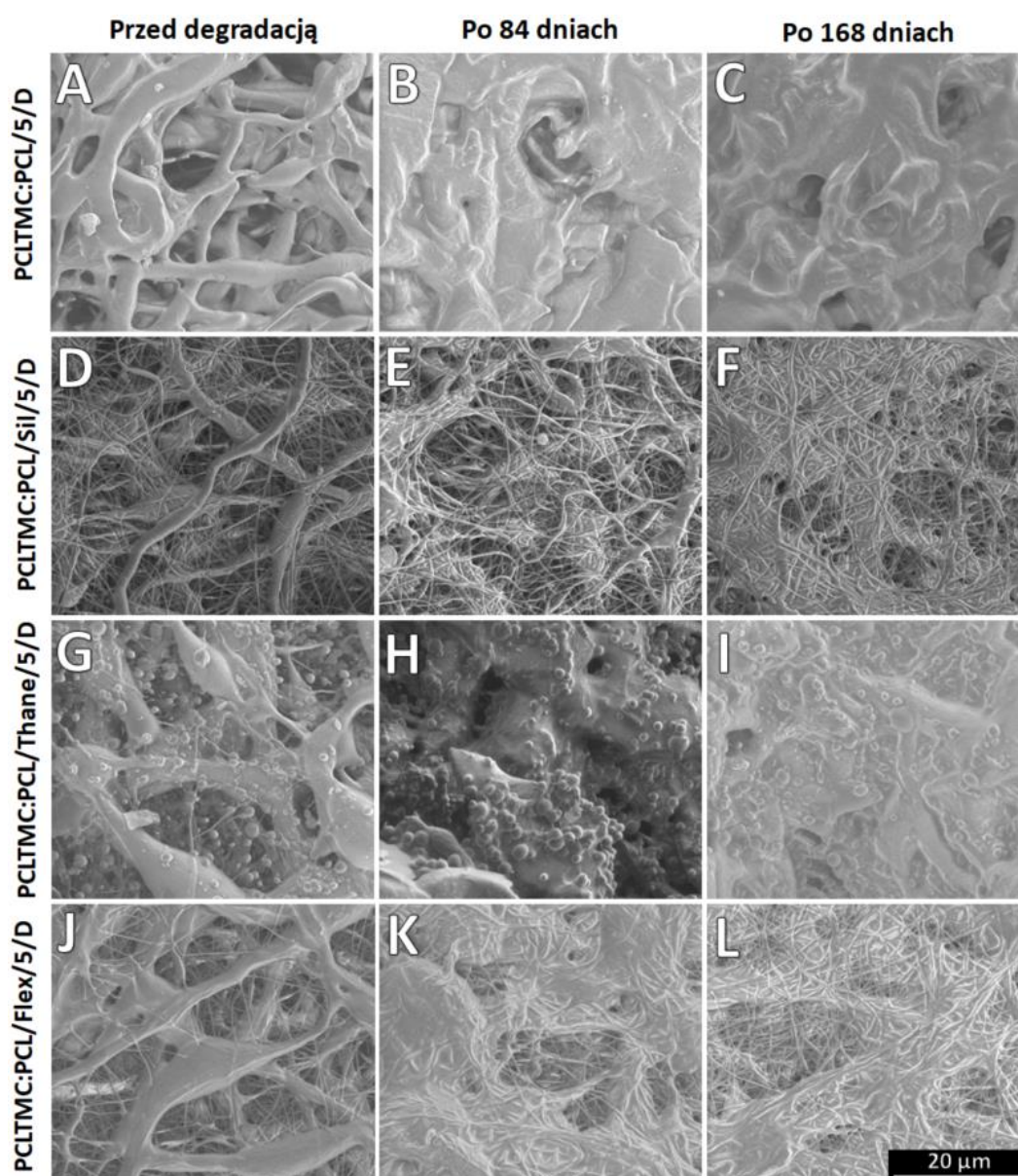
Morfologię powierzchni włókien otrzymanych metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia przedstawiono na Rys. 70. Zaobserwowano, że wprowadzenie PCL do PCLTMC pomimo pewnej stabilizacji kształtu włókien, spowodowało powstanie struktury „pseudowłóknistej”, bardziej zbliżonej

do porowatej membrany, w której można jednak wyszczególnić poszczególne elementy składowe, pierwotnie będące włóknami. Niemniej jednak, w dalszej części pracy otrzymaną strukturę określano mianem „włókniny”, gdyż podstawową jednostką strukturalną było włókno. Poprawę jakości można było w tym przypadku uzyskać zwiększając zawartość PCL, co wywołałoby jednak wzrost hydrofobowości oraz ilości fazy krystalicznej, która utrudnia uwalnianie leków oraz spowalnia degradację, co potencjalnie mogło wydłużyć czas konieczny do zaobserwowania oznak degradacji w materiale. Podejrzewa się również, że sama obserwacja za pomocą mikroskopii SEM spowodowała pewne zmiany w morfologii powierzchni badanych próbek, ze względu na oddziaływanie strumienia elektronów z PCLTMC:PCL, prowadzące do podniesienia temperatury, co przy niskim T_g mogło spowodować płynięcie polimeru. Niemniej jednak, przed degradacją możliwe było wyszczególnienie poszczególnych rodzajów włókien w otrzymanych materiałach.

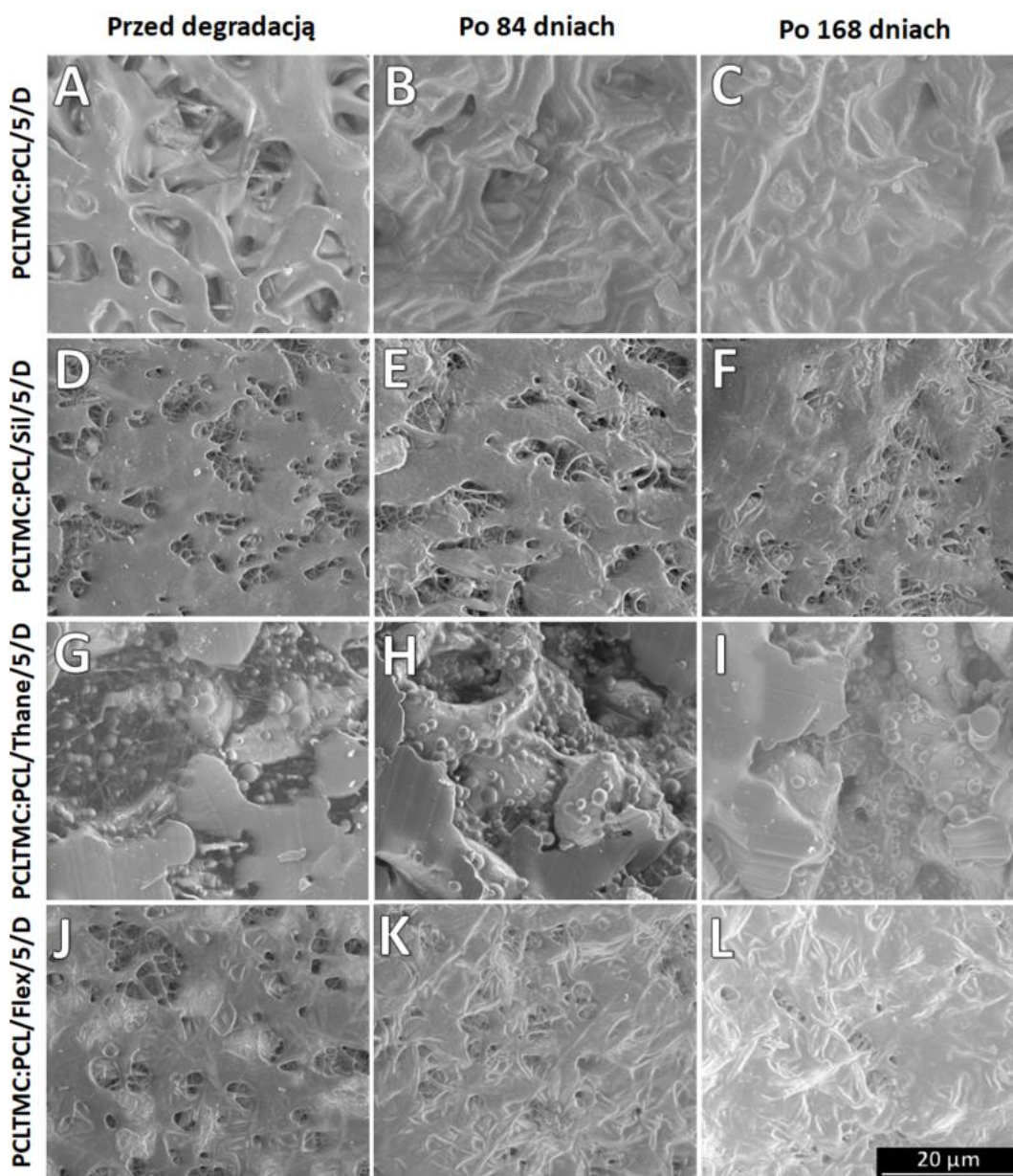


Rys. 70. Obrazy SEM (x2500) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włóknin PCLTMC:PCL/PCU bez leków

Inkubacja próbek w medium o temperaturze 37 °C spowodowała zapadnięcie się struktury, skutkujące zmniejszeniem się powierzchni właściwej oraz objętości przestrzeni pomiędzy włóknami. Mieszanina PCLTMC:PCL wykazywała tendencję do zlewania się, z wytworzeniem zwartej struktury. Efekt ten był najsilniejszy w materiałach niezmodyfikowanych za pomocą PCU oraz zawierających HydroThane, co najprawdopodobniej wynikało z nieco większej ilości wchłoniętej wody, która działała jak plastyfikator, ułatwiając przemieszczanie się łańcuchów polimerowych względem siebie. Zjawisku temu sprzyjał fakt, że PCLTMC:PCL w temperaturze inkubacji znajdował się w stanie lepkosprężystym. Z tego powodu nie przeprowadzono pomiarów średnic włókien frakcji biodegradowalnej. Wielkość nanowłókien PCU nie odbiegała zbytnio od uzyskanej w eksperymentach wykorzystujących PDLGA, jako nośnik leku. W przypadku poliuretanu ChronoSil było to 690 ± 80 nm, dla HydroThane 301 ± 39 nm, a nanowłókna ChronoFlex miały średnice wynoszące 514 ± 123 nm.



Rys. 71. Obrazy SEM (x2500) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PCLTMC:PCL/PCU zawierających 5% DiNa



Rys. 72. Obrazy SEM (x2500) przedstawiające zmiany morfologii powierzchni w czasie degradacji hydrolytycznej włókien PCLTMC:PCL/PCU zawierających 5% SLM

W materiałach niezawierających leków, niezależnie od ich składu, nie zaobserwowano erozji powierzchni w postaci porów i wżerów oraz innych objawów postępu degradacji, poza wspomnianym wcześniej zapadnięciem się struktury włókniny (Rys. 70). Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku próbek zawierających 5% dodatek substancji aktywnych. Łatwo rozpuszczalny w wodzie DiNa powinien doprowadzić do powstania nanoporów, od których mogłyby się rozpocząć erozja powierzchni PCLTMC:PCL. Jednak, w czasie trwania eksperymentu nie powstały tego typu struktury (Rys. 71). Potencjalnym wyjaśnieniem mógł być zbyt krótki czas obserwacji lub szybkie zapadanie się i zlewanie powstałych porów w jednolitą masę, ze względu na bardzo niską temperaturę zeszklenia polimeru. W przypadku powierzchni zawierającej trudno rozpuszczalny sirolimus, można było zaobserwować połączenie się biodegradowalnej frakcji polimeru w jednolitą całość, pozostawiając

jedynie nieliczne kanały, które w trakcie postępu degradacji ulegały dalszemu zapadaniu się, jeszcze bardziej zmniejszając pole powierzchni właściwej materiału. Rozróżnienie poszczególnych włókien nie było możliwe, ponieważ warstwa ta była formowana jako pierwsza, bezpośrednio na powierzchni kolektora, do której była dociskana przez kolejno elektroprzędzone warstwy. Biorąc pod uwagę niskie T_g , doszło do pełzania lub/i płynięcia plastycznego polimeru, co spowodowało, że uzyskano strukturę bardziej przypominającą porowatą membranę (Rys. 72).

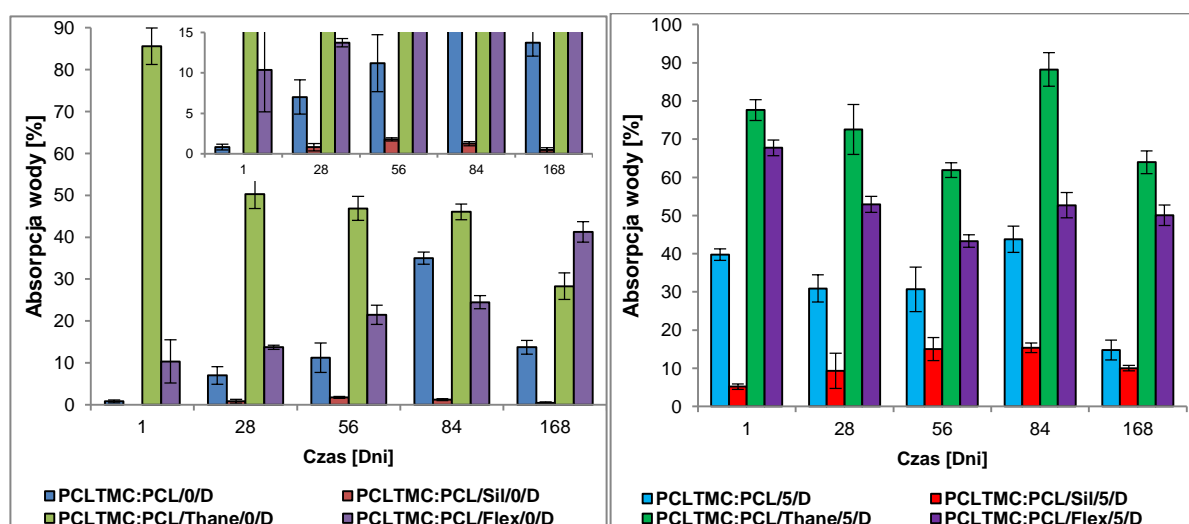
W *Eksperymencie 1* (Rozdział 15.1.1.) oraz *Eksperymencie 2* (Rozdział 15.2.1.), za sprawą zmiany przewodnictwa roztworów PDLGA podczas elektroprzędzenia, które miało miejsce na skutek dodatku leków oraz wzajemnego oddziaływania na siebie pól elektrycznych generowanych przez jednoimiennie naładowane strumienie, uzyskano różne wyjściowe średnice włókien kopoliestru. Mogło to mieć wpływ na przebieg procesów degradacji hydrolytycznej oraz uwalniania leków, ze względu na niejednakowy stosunek powierzchni do objętości matrycy, mający wpływ na drogę dyfuzji oraz kontakt z otaczającym medium. Z tego względu, poprzez zmianę PLGA na mieszaninę PCLTMC:PCL podjęto próbę uzyskania zbliżonych struktur materiału niezależnie od obecności leków oraz typu modyfikatora PCU. Zabieg ten miał na celu uśrednienie morfologii włókien w celu eliminacji wpływu różnic w wartościach średnic włókien matrycy na procesy związane z degradacją i uwalnianiem leków. Uzyskano zadowalający efekt, pomimo znacznej redukcji rozwinięcia powierzchni właściwej materiałów. Zaletą wykorzystanego rozwiązania było również ustabilizowanie morfologii włókien w czasie całego eksperymentu, trwającego 168 dni. Największe zmiany, związane z zapadaniem się wolnych przestrzeni miały jednak miejsce w początkowym okresie inkubacji, mniej więcej do 28-35 dnia, kiedy to powierzchnia zewnętrzna materiałów, niezależnie od obecności leków i modyfikatorów PCU przyjęła względnie stałą formę. Z wcześniej opisanych przyczyn nie udało się uzyskać takiej samej morfologii powierzchni pomiędzy stronami włókniny zawierającymi DiNa oraz SLM, jednak były one wystarczająco do siebie zbliżone. Co więcej, wyeliminowano wpływ łatwo rozpuszczalnej soli sodowej diklofenaku na rozwinięcie powierzchni włókien nośnika. Pozwoliło to na stabilizację dyfuzji leków, wody oraz produktów degradacji przez fazę amorficzną PCLTMC:PCL w czasie inkubacji włókien w wodnym roztworze PBS.

16.1.2. *Pomiary absorpcji wody przez włókniny PCLTMC:PCL/PCU*

Ze względu na większą hydrofobowość mieszaniny PCLTMC:PCL od kopolimeru PDLGA, zaobserwowano, że otrzymane w *Eksperymencie 3* włókniny wykazywały mniejszą zdolność do absorbowania wody (Rys. 73). Różnica wynikała również z uzyskania bardziej zwartej struktury, niezawierającej zbyt wiele wolnych przestrzeni, o czym świadczyły obrazy SEM.

W przypadku próbek, do których nie wprowadzono leków, największą chłonność wykazywały włókniny zmodyfikowane za pomocą higroskopijnych nanowłókien HydroThane. PCU był zdolny do absorpcji do 20% wag. medium inkubacyjnego. Biorąc pod uwagę skład materiału, gdzie poliuretan stanowił około 40% wag., teoretycznie mógł on pobrać nie więcej niż 8% H_2O , w odniesieniu do całej masy próbki. Ilość wchłoniętej wody przez włókninę PCLTMC:PCL/Thane/0/D po jednym dniu wynosiła $86\pm 8\%$, co było najwyższym rezultatem. W wyniku zapadnięcia się struktury w czasie degradacji hydrolytycznej oraz łączenia się włókien w jednolitą całość (Rys. 70), wartość ta uległa

zmniejszeniu do $46\pm 4\%$ po 84 dniach i $28\pm 6\%$ po 168 dniach. Pozostałe materiały posiadały mniejszą zdolność do absorbowania wody. Wprowadzenie do nanowłókien ChronoFlex, który pomimo najwyższej hydrofilowości (kąąt zwilżania $69,0\pm 2,4$) nie był materiałem higroskopijnym, spowodowało wzrost ilości pobranego roztworu PBS podczas inkubacji. Po 1 dniu uzyskano $10\pm 5\%$, co było drugim najwyższym wynikiem. Prawdopodobnie na skutek mniejszego zapadania się struktury w czasie inkubacji, wynikającego z większej sztywności nanowłókien ChronoFlex, materiał PCLTMC:PCL/Flex/0/D po 84 dniach wchłonął $24\pm 3\%$ medium degradacyjnego, co wciąż było mniejszym wynikiem niż uzyskany dla włókniny zawierającej HydroThane. Jednak po 168 dniach wykazywał już najwyższą absorpcję wody, na poziomie $41\pm 5\%$. W przypadku niezmodyfikowanej włókniny PCLTMC:PCL/0/D, zaobserwowano nieco mniejszą chłonność niż opisane powyżej materiały, jednak po 84 dniach, wykazywała drugą najwyższą wartość wynoszącą $35\pm 3\%$, która następnie zmniejszyła się wraz z postępem procesu degradacji hydrolytycznej do $14\pm 3\%$. Wprowadzenie hydrofobowego ChronoSilu spowodowało, że próbki w czasie trwania eksperymentu praktycznie nie absorbowały wody. Najwyższą wartość wynoszącą $2\pm 1\%$ uzyskano po 56 dniach. Zaobserwowano bardzo silną hydrofobizację włókniny, wynikającą z zastosowania dwóch frakcji włókien polimerowych o stosunkowo słabym powinowactwie do wody.



Rys. 73. Ilość zaabsorbowanej wody przez włókniny PCLTMC:PCL/PCU bez leków (z lewej) oraz zawierające po 5% DiNa i SLM (z prawej) ($\bar{x}\pm SD$; N=3)

Uwalnianie leków spowodowało wchłonięcie większej ilości wody przez włókniny (Rys. 73). Ilość zaabsorbowanego medium degradacyjnego zmieniała się w czasie inkubacji, w zależności od przypadku ulegając wzrostowi lub zmniejszeniu. Takie fluktuacje wynikały najprawdopodobniej ze zmniejszania się objętości wolnych przestrzeni w obrębie materiału, na skutek zapadnięcia się struktury, wywołanej płynięciem PCLTMC:PCL w temperaturze inkubacji powyżej T_g (spadek ilości wchłoniętej wody), a także dyfuzji wody przez jej fazę amorficzną (wzrost ilości wchłoniętej wody). Tendencje zaobserwowane w przypadku próbek uwalniających leki były takie same jak dla materiałów referencyjnych. Ponownie, największą chłonność wody spowodowała modyfikacja matrycy za pomocą nanowłókien HydroThane. Ilość zaabsorbowanego medium degradacyjnego utrzymywała średnio na

poziomie $73\pm 11\%$ w czasie całego eksperymentu. Nieco niższe wyniki uzyskano w przypadku nanowłókien ChronoFlex, gdzie pomimo niewielkiej tendencji spadkowej, średnia chłonność wody utrzymywała się na poziomie $53\pm 9\%$. W przypadku włókniny PCLTMC:PCL/0/D, różnice pomiędzy poszczególnymi punktami pomiarowymi w czasie 84 dni były niewielkie. Początkowo zanotowano niewielki spadek ilości zaabsorbowanej wody, związane ze zmniejszeniem się objętości wolnych przestrzeni, a następnie chłonność zaczęła wzrastać. Średnia absorpcja H_2O uzyskana w tym okresie wyniosła $36\pm 7\%$. Po 168 dniach nastąpił spadek ilości pobranej z otoczenia wody do $15\pm 5\%$. Najniższe wyniki ponownie uzyskano dla wariantu modyfikacji włókniny za pomocą hydrofobowego ChronoSilu. W tym przypadku chłonność wzrastała z $5\pm 2\%$ do $15\pm 6\%$ przez 56 dni, a następnie zaczęła maleć do wartości $10\pm 1\%$ po 168 dniach.

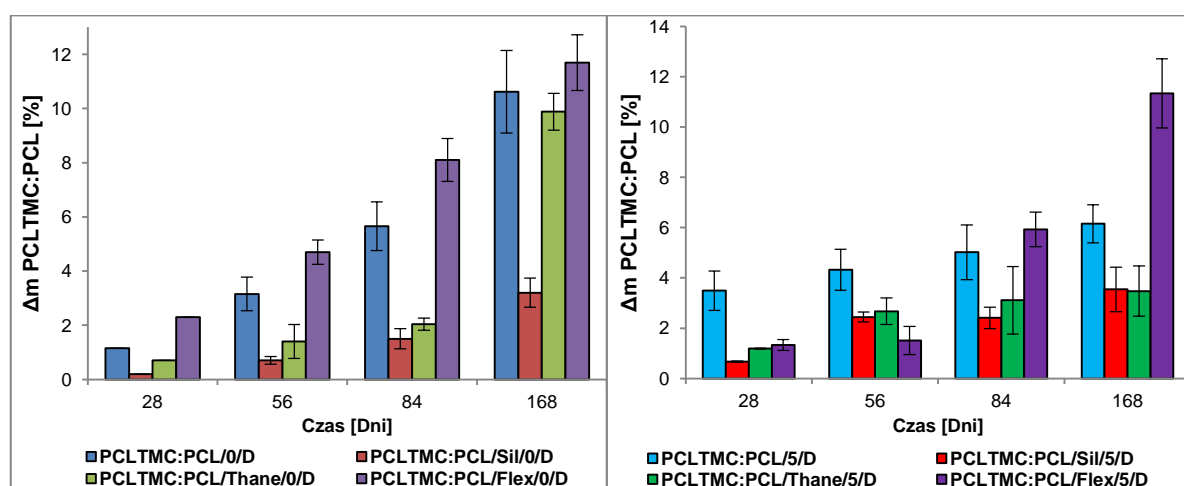
Zaobserwowano, że tendencje dotyczące działania poszczególnych modyfikatorów PCU oraz wpływu leków na ilość zaabsorbowanej wody, pomimo wykorzystania bardziej hydrofobowego polimeru biodegradowalnego oraz znacznie mniejszego stosunku powierzchni do objętości otrzymanych włókien, były zbliżone do uzyskanych w przypadku materiałów zawierających PDLGA. Świadczyło to o podobnym wpływie wymienionych czynników na powinowactwo włókien do otaczającego je środowiska, co było punktem wyjścia do zmiany szybkości degradacji matrycy, a także regulacji profili uwalniania leków.

16.1.3. Badanie szybkości erozji na podstawie pomiarów ubytku wagowego PCLTMC:PCL

Na skutek procesów degradacji hydrolitycznej i erozji, podczas inkubacji w wodnym roztworze PBS nastąpił spadek wagi matrycy PCLTMC:PCL. Był on jednak znacznie mniejszy niż w przypadku PDLGA, gdyż w żadnej z badanych próbek nie przekroczył 15% wag. po 168 dniach (Rys. 74). Najszybszą erozję biodegradowalnej frakcji w całym okresie prowadzenia obserwacji wykazywała włóknina zmodyfikowana nanowłóknami najbardziej hydrofilowego ChronoFlexu. Wartość Δm PCLTMC:PCL po 168 dniach osiągnęła wartość $11,7\pm 4,1\%$. Nieco wolniej zmieniała się waga włókniny referencyjnej, jednak ostatecznie erozja była tu niewiele wolniejsza niż w poprzednim przypadku (Δm $10,6\pm 1,8\%$). Wprowadzenie nanowłókien higroskopijnego HydroThane, pomimo zwiększenia ilości zaabsorbowanej wody, nie przyspieszyło procesów erozji biodegradowalnej frakcji polimeru. Do 84 dnia wartość ubytku wagowego była znacznie niższa, niż dla próbek PCLTMC:PCL/0/D i PCLTMC:PCL/Flex/0/D, jednak po 168 dniach uzyskano zbliżony wynik wynoszący $9,9\pm 1,9\%$. W przeciwieństwie do rezultatów zmierzonych dla matrycy PDLGA, modyfikacja PCLTMC:PCL za pomocą nanowłókien ChronoSil spowodowała, że ubytek wagi był najmniejszy spośród zbadanych włókien. Po 84 dniach wynosił $1,5\pm 0,5\%$, a po 168 dniach $3,2\pm 0,8\%$. Wynik ten wskazywał na największe spowolnienie degradacji hydrolitycznej, a także utrudnienie procesów dyfuzji powstającej w wyniku hydrolizy niskocząsteczkowej frakcji polimeru do otoczenia, za sprawą małej ilości zaabsorbowanej wody oraz największej hydrofobowości włókniny.

Wprowadzenie po 5% SLM i DiNa nie spowodowało dużych zmian w szybkości erozji matrycy PCLTMC:PCL (Rys. 74). Do 56 dnia we wszystkich materiałach, poza zawierającym nanowłókna ChronoFlex, zanotowano jednak nieco wyższe wartości Δm , niż w przypadku włókien do których nie wprowadzono leków. Ubytek wagi PCLTMC:PCL wynikał zarówno z uwalniania leków, ich wpływu na

degradację matrycy, jak i działania danego modyfikatora PCU. Uwalnianie substancji aktywnych miało większe znaczenie na początku inkubacji, w późniejszym etapie główny wpływ na proces erozji wykazywało usuwanie niskocząsteczkowej frakcji oligomerów, powstałych w wyniku reakcji hydrolizy. Z tego powodu, znaczącą zmianę wagi matrycy włókniny PCLTMC:PCL/Flex/5/D zaobserwowano dopiero po 84 dniach. Do tego czasu charakteryzowała się ona niewielkim ubytkiem wagi. Na tym etapie inkubacji osiągnęła ona najwyższą wartość współczynnika Δm spośród wszystkich materiałów, a po 168 dniach dorównała wynikowi uzyskanemu dla włókniny zawierającej nanowłókna ChronoFlex, która nie uwalniała leków ($11,3 \pm 1,5\%$). Pozostałe materiały uwalniające substancje aktywne charakteryzowały się wolniejszą erozją. Prawdopodobnie łatwo rozpuszczalna sól sodowa diklofenaku nie spowodowała w tym przypadku znaczącego przyspieszenia degradacji w dłuższej perspektywie czasu, ponieważ powstałe pory szybko zniknęły z powodu zapadania się matrycy PCLTMC:PCL w temperaturze inkubacji, co potwierdzały obserwacje mikroskopowe (brak wżerów na powierzchni). Z drugiej strony sirolimus potencjalnie działał tak jak w przypadku PDLGA, hydrofobizując włókna nośnika i spowalniając jego degradację. Uwzględniając wszystkie czynniki, po 168 dniach Δm włókniny PCLTMC:PCL/5/D wyniosło $6,2 \pm 0,3\%$, dla PCLTMC:PCL/Thane/5/D $3,5 \pm 0,9\%$ a dla PCLTMC:PCL/Sil/5/D było to w zasadzie tyle samo, co w wariancie bez leków czyli $3,5 \pm 0,7\%$.



Rys. 74. Średni ubytek wagi matrycy PCLTMC:PCL (Δm PCLTMC:PCL) podczas erozji włókien bez leków (z lewej) oraz zawierających po 5% SLM oraz DiNa (z prawej) ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Na podstawie uzyskanych wyników można było zaobserwować, że proces erozji PCLTMC:PCL, w porównaniu do kopoliestru PDLGA, wykazywał znacznie mniejszą szybkość. Różnica wynikała z większej hydrofobowości matrycy, która zmniejszała powinowactwo materiału do wody, będącej czynnikiem powodującym rozkład wiązań estrowych w polimerze. Ponadto, mniejszy stosunek powierzchni do objętości utrudnił transport produktów degradacji do otoczenia poprzez wydłużenie drogi dyfuzji, co zostało potwierdzone w dalszych badaniach.

16.1.4. Badanie zmian średnich mas molowych oraz dyspersyjności PCLTMC:PCL podczas degradacji hydrolytycznej

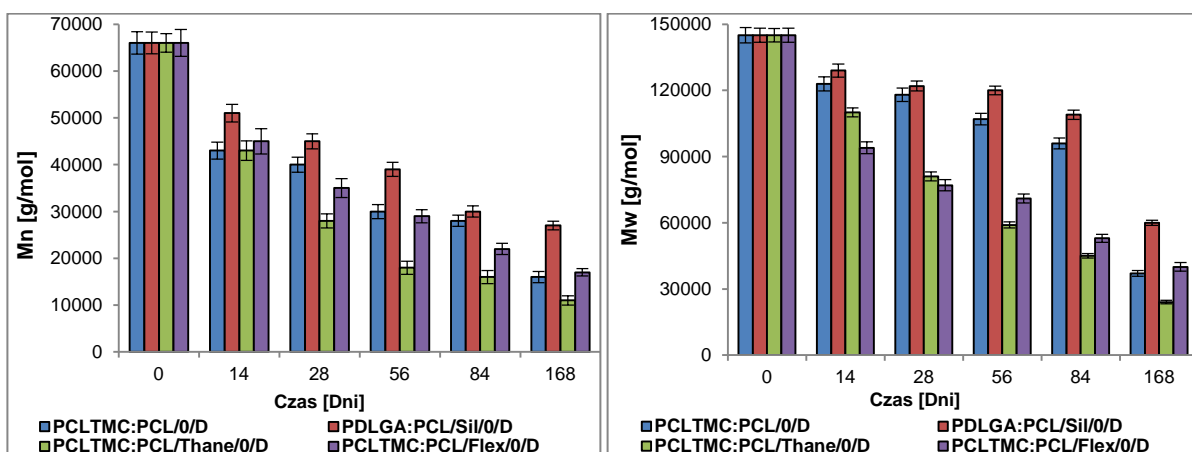
W celu zbadania szybkości degradacji hydrolytycznej PCLTMC:PCL, metodą GPC wyznaczono zmiany liczbowo średniej masy molowej \overline{M}_n oraz wagowo średniej masy molowej \overline{M}_w . Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 75. W *Eksperymencie 3* biodegradowalny polimer był bardziej hydrofobowy niż PDLGA i tylko jeden z poliuretanowych modyfikatorów - ChronoSil wykazywał większą od niego wartość kąta zwilżania. Miało to swoje odzwierciedlenie w makroskopowej hydrofilowości włókniny i wpłynęło na szybkość oraz prawdopodobny mechanizm degradacji.

Rozpatrując idealne warunki, w przypadku degradacji polimeru w masie, jego waga nie zmieniałaby się, przed osiągnięciem pewnej krytycznej masy molowej, umożliwiającej rozpuszczenie się polimeru w medium degradacyjnym, co doprowadziłoby do gwałtownej erozji. Podczas degradacji powierzchniowej, waga matrycy zmniejszałaby się sukcesywnie, gdyż erozja miałaby miejsce w cienkiej warstwie na granicy faz (froncie erozji), gdzie niskocząsteczkowe produkty rozkładu łańcuchów polimerowych byłyby natychmiast transportowane do objętości medium, zaś woda nie wnikałaby zbyt głęboko do wnętrza materiału. W rzeczywistości jednak, oba mechanizmy zachodzą równocześnie i konkurują ze sobą. W czasie degradacji hydrolytycznej ustala się pomiędzy nimi stan równowagi, który ulega dynamicznym zmianom, wraz ze spadkiem masy molowej, pojawieniem się produktów rozkładu polimeru, postępowaniem erozji, zmianami morfologii próbki oraz zawartością fazy krystalicznej. Najczęstszym przypadkiem jest dominacja jednego z mechanizmów dla danego polimeru o zdefiniowanym kształcie i stosunku powierzchni do objętości (P:V).

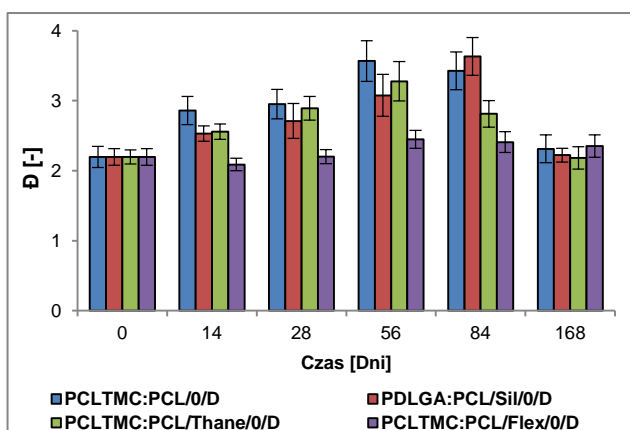
W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowano, że pomimo niewielkiego ubytku wagowego Δm matrycy PCLTMC:PCL, w czasie 168 dni inkubacji wystąpiły duże zmiany \overline{M}_n i \overline{M}_w we wszystkich wariantach modyfikacji włóknin. Zazwyczaj taki wynik świadczy o faworyzowaniu procesów degradacji i erozji zachodzących w masie, które charakteryzują się szybszym transportem wody w głąb objętości polimeru, przy wolniejszej hydrolyzie. Pomimo większej hydrofobowości PCLTMC:PCL, a także bardziej zwartej strukturze próbki, woda została zaabsorbowana przez niezmodyfikowaną włókninę odniesienia (Rys. 73). Wynikało to z głównie amorficznej struktury matrycy połączonej z jej niską temperaturą zeszklenia. W temperaturze inkubacji (37 °C) mieszanina PCLTMC:PCL znajdowała się 75 °C powyżej T_g , co wpłynęło na zwiększenie ruchliwości łańcuchów polimeru oraz zmniejszenie oporów dyfuzyjnych dla wody. W przypadku kopolimeru PCLTMC występowanie stosunkowo odpornych na hydrolyzę wiązań węglanowych, spowolniło rozkład łańcuchów polimeru i pozwoliło na wniknięcie wody w głąb struktury. W warunkach, gdy spęcznienie polimeru było niewielkie, powstające kwaśne produkty degradacji nie mogły być szybko odprowadzone do otoczenia. Sprzyjało to autokatalizie hydrolyzy wiązań estrowych w blokach kaproilowych. Lokalne obniżenie pH było jednak bardzo małe w porównaniu do degradacji PDLGA, ze względu na mniejszą kwasowość kwasu kapronowego (pK_a 4,09) w porównaniu do kwasu mlekowego (pK_a 3,86) czy glikolowego (pK_a 3,83), miało zatem mniejsze znaczenie. Zapadnięcie się struktury włókniny na skutek degradacji spowodowało zmniejszenie stosunku P:V, co ze względu na wydłużenie drogi dyfuzji produktów degradacji sprzyjało procesowi erozji w masie. Wypadkowa wszystkich wspomnianych czynników wpłynęła na szybkość degradacji PCLTMC:PCL

w poszczególnych materiałach oraz mechanizmie tego procesu. Co więcej, odnosząc wartości \overline{M}_n i \overline{M}_w do ubytku wagowego Δm , można było zauważyć, że wzajemny stosunek szybkości erozji homogenicznej i heterogenicznej ulegał pewnym zmianom w czasie inkubacji włókien, co zostało opisane poniżej.

W czasie 84 dni degradacji hydrolytycznej wartości liczbowo średniej masy molowej \overline{M}_n i wagowo średniej masy molowej \overline{M}_w niezmodyfikowanej włókniyny PCLTMC:PCL zmniejszyły się odpowiednio z 66000 ± 2400 g/mol i 145000 ± 3500 g/mol do 28000 ± 1200 g/mol i 96000 ± 2500 g/mol, a po 168 dniach do 16000 ± 1200 g/mol i 37000 ± 1300 g/mol. Dyspersyjność wzrosła z $2,20 \pm 0,15$ do $3,57 \pm 0,29$ w czasie 56 dni, co świadczyło o powstawaniu niskocząsteczkowych produktów ubocznych degradacji wewnątrz matrycy. Jednak później, wartość \overline{D} zaczęła się zmniejszać, co w połączeniu ze wzrostem ubytku wagowego wskazywało na transport oligomerów do otoczenia oraz hydrolizę łańcuchów o wysokiej masie molowej w obrębie całej struktury materiału. Po 84 dniach wartość dyspersyjności wynosiła $3,43 \pm 0,27$, a po 168 dniach powróciła niemal do wartości wyjściowej osiągając $2,31 \pm 0,20$. Analizując wykresy zależności średnich mas molowych (Rys. 75), dyspersyjności (Rys. 76) oraz ubytku wagowego (Rys. 74) od czasu inkubacji, stwierdzono, że w przypadku materiału odniesienia, procesy degradacji i erozji zachodziły z podobną szybkością w masie i na powierzchni.



Rys. 75. Zmiany liczbowo średniej masy molowej (M_n) (po lewej) oraz wagowo średniej masy molowej (M_w) (po prawej) PCLTMC:PCL w czasie degradacji hydrolytycznej ($\bar{x} \pm SD$; N=3)



Rys. 76. Zmiany dyspersyjności PCLTMC:PCL w czasie degradacji hydrolytycznej ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Wprowadzenie modyfikatorów PCU do włókien wywołało zmiany w szybkości degradacji PCLTMC:PCL. Nanowłókna jedyne z poliuretanów, który był bardziej hydrofobowy od matrycy - ChronoSilu, spowodowały, że zmiana wartości \overline{M}_n i \overline{M}_w była najmniejsza w czasie eksperymentu. Włóknina wykazywała również najmniejszą wartość ubytku wagowego (Δm) frakcji biodegradowalnej (Rys. 74), a także znikomą chłonność wody (Rys. 73). Po 84 dniach, liczbowo i wagowo średnie masy molowe PCLTMC:PCL wynosiły odpowiednio 30000 ± 1200 g/mol i 109000 ± 2100 g/mol. Z tego względu założono, że degradacja w masie zachodziła tu nieco szybciej niż powierzchniowo, chociaż oba procesy były powolne. Wzrost dyspersyjności z $2,20 \pm 0,12$ do $3,63 \pm 0,27$ w tym okresie świadczył o powstawaniu niskocząsteczkowej frakcji polimeru, która nie była skutecznie transportowana do medium degradacyjnego, co potwierdziło wcześniejsze stwierdzenie dotyczące głównego mechanizmu erozji. Po upływie 168 dni \overline{M}_n i \overline{M}_w wynosiły odpowiednio 27000 ± 900 g/mol i 60000 ± 1200 g/mol. Jak widać, spadek wagowo średniej masy molowej był w tym przypadku znaczny, co odbiło się na zmniejszeniu dyspersyjności ($2,22 \pm 0,10$). Brak wyraźnej zmiany \overline{M}_n przy dość znaczącym obniżeniu \overline{M}_w bardziej świadczył o rozłożeniu wysokocząsteczkowej frakcji polimeru, niż o usunięciu do otoczenia oligomerów, ze względu na niewielką zmianę wagi matrycy (Δm) po 168 dniach (Rys. 74).

Modyfikacja włókniny PCLTMC:PCL za pomocą nanowłókien najbardziej hydrofilowego PCU, ChronoFlexu, poprzez zwiększenie zdolności do absorbowania wody spowodowała przyspieszenie degradacji hydrolytycznej matrycy. Skutkiem był największy ubytek wagi matrycy spośród badanych materiałów, jednak zmiany \overline{M}_n i \overline{M}_w nie były największe, chociaż do 56 dnia włóknina ta wykazywała najszybszy spadek wagowo średniej masy molowej. Po 84 dniach wartości wspomnianych parametrów wynosiły odpowiednio 22000 ± 1200 g/mol i 53000 ± 1800 g/mol, a po upływie 168 dni 17000 ± 800 g/mol i 40000 ± 2000 g/mol. Zaobserwowano również, że w czasie inkubacji dyspersyjność PCLTMC:PCL w materiale zawierającym nanowłókna ChronoFlex ulegała jedynie niewielkim zmianom. Świadczyło to o skutecznym transporcie produktów degradacji do otoczenia, wynikającym ze stosunkowo dobrego wchłaniania wody przez włókninę, a także wykorzystania PCU o dość wysokim T_g , co utrudniało zapadanie się struktury wewnątrz materiału. Sama obecność nanowłókien ChronoFlexu, wydłużyła drogę dyfuzji, jednak przy wolniejszym przebiegu procesów w obrębie materiału, nie był to prawdopodobnie czynnik limitujący. Sposób degradacji i erozji włókniny PCLTMC:PCL/Flex/0/D był zbliżony do zaobserwowanego w przypadku materiału referencyjnego, przy czym zachodził on nieco szybciej w początkowej fazie inkubacji.

Najszybciej degradującymi włókninami okazały się te, do których wprowadzono hydrofilowy i higroskopijny HydroThane. Wartości \overline{M}_n i \overline{M}_w po 84 dniach wynosiły 16000 ± 1400 g/mol i 45000 ± 1000 g/mol, a po 168 dniach 11000 ± 1000 g/mol i 24000 ± 800 g/mol, co było najniższym rezultatem. Pomimo, znacznej absorpcji wody, ubytek wagowy Δm PCLTMC:PCL był dość niski do 84 dnia eksperymentu. W tym czasie zaobserwowano również wzrost \bar{D} z $2,19 \pm 0,10$ do $3,28 \pm 0,28$ (po 56 dniach), który świadczył o obecności oligomerów w materiale. Biorąc pod uwagę te wyniki, można przypuszczać, że w przypadku PCLTMC:PCL/Thane/0/D promowana była degradacja w masie. Co istotne, na końcu eksperymentu dyspersyjność spadła do wartości początkowej. Prawdopodobnie masa molowa niskocząsteczkowych produktów ubocznych była na tyle niska, że na skutek absorpcji

wody przy malejącym oporze dyfuzji, mogły one zostać łatwiej przetransportowane do wodnego roztworu PBSu. Stąd skokowy wzrost ubytku wagowego matrycy (Rys. 74), szczególnie widoczny dla włókien PCLTMC:PCL/0/D i PCLTMC:PCL/Thane/0/D.

16.1.5. Badanie zmian składu molowego PCLTMC:PCL w czasie degradacji hydrolytycznej

Wprowadzenie do kopolimeru PCLTMC 10% wag. homopolimeru PCL zmieniło stosunek molowy jednostek węglanu trimetylenu do kaproilowych w mieszaninie z 60:40% mol na 54:46% mol. Uzyskane za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H NMR wyniki przedstawiono w Tabeli 43.

Tabela 43. Zmiany składu molowego mieszaniny PCLTMC:PCL podczas degradacji hydrolytycznej

Skład włókniny	Stosunek molowy TMC:CL [%]					
	Dzień 0	Dzień 14	Dzień 28	Dzień 56	Dzień 84	Dzień 168
PCLTMC:PCL/0/D	54:46	53:47	54:46	53:47	54:46	54:46
PCLTMC:PCL /5/D	54:46	54:46	54:46	54:46	54:46	53:47
PCLTMC:PCL /Siil/0/D	54:46	53:47	54:46	55:45	57:43	56:44
PCLTMC:PCL /Siil/5/D	54:46	54:46	57:43	56:44	57:43	55:45
PCLTMC:PCL /Thane/0/D	54:46	53:47	52:48	52:48	51:49	50:50
PCLTMC:PCL /Thane/5/D	54:46	55:45	54:46	54:46	55:45	55:45
PCLTMC:PCL/Flex/0/D	54:46	53:47	55:45	56:44	57:43	55:45
PCLTMC:PCL/Flex/5/D	54:46	53:47	58:42	57:43	54:46	53:47

W przypadku włókniny niezmodyfikowanej za pomocą nanowłókien PCU nie zaobserwowano większych zmian w składzie molowym, niezależnie od obecności leków. Występowały jedynie pewne fluktuacje, nieprzekraczające 1% mol. W przypadku włókien zawierających nanowłókna ChronoSil, zmiany były wyraźniejsze. Świadczyły one o zmniejszeniu się zawartości jednostek kaproilowych w łańcuchach o 3% mol. (maksymalna zmiana) niezależnie od obecności leków, jednak zaobserwowano je po innym czasie inkubacji, mianowicie, w próbce PCLTMC:PCL/Siil/5/D zmiany wystąpiły już po 28 dniach, natomiast w PCLTMC:PCL/Siil/0/D po 84 dniach. W przypadku włókniny zmodyfikowanej nanowłóknami HydroThane zanotowano inną tendencję. W próbkach bez leków to zawartość bloków węglanowych w łańcuchu malała. Po 84 dniach zmiana wynosiła 3% mol., a po 168 dniach, 4% mol. Wprowadzenie substancji aktywnych względnie ustabilizowało skład molowy na stałym poziomie w tym materiale. Mniejszy ubytek wagowy we włókninie PCLTMC:PCL/Thane/5/D po 168 dniach, w stosunku do odpowiednika niezawierającego leków mógł sugerować spowolnienie procesów erozyjnych na skutek uwolnienia całej ilości leków do 84 dnia, co przy dość dobrym spęcznieniu, utrzymującym się przez cały czas inkubacji skutecznie wspomagało transport produktów degradacji do otoczenia. W przypadku włókniny zawierającej nanowłókna ChronoFlex, zaobserwowano dość podobną tendencję zmian do materiału zmodyfikowanego za pomocą ChronoSilu. Była to nieoczekiwana obserwacja, gdyż oba PCU znacznie różniły się kątem zwilżania, więc spodziewano się różnych wyników analizy. W przypadku włókniny PCLTMC:PCL/Flex/0/D maksymalna zmiana składu molowego miała miejsce po 84 dniach, kiedy to zanotowano 3% mol

spadek zawartości jednostek kaproilowych. Po wprowadzeniu leków efekt ten zaobserwowano szybciej, gdyż już po 28 dniach zawartość jednostek węglanowych w łańcuchu zwiększyła się o 4% mol.

W omawianym eksperymencie nie zaobserwowano konkretnych tendencji odnośnie zmian składu molowego PCLTMC:PCL. Pewną przeszkodą był 10% dodatek semikrystalicznego homopolimeru PCL, pełniącego rolę stabilizatora włókien. Ze względu na obecność fazy krystalicznej trudniej ulegającej hydrolizie, PCL mógł zawyżać ilość jednostek kaproilowych w PCLTMC:PCL. Wydaje się zatem, że największy wpływ na uzyskane wyniki miała w tym przypadku statystyka, wynikająca z mikrostruktury PCLTMC. Jak obliczono w Rozdziale 12.2, kopolimer charakteryzował się wysokim stopniem randomizacji ($R=0,99$) oraz stosunkowo krótkimi blokami pochodzącymi od ϵ -kapolaktonu (CL) (L_{CL}^e 1,68) i węglanu trimetyleny (TMC) (L_{TMC}^e 2,52). Z tego względu łańcuchy o różnej długości mogły mieć ten sam skład molowy. Dopiero frakcja oligomerów wykazywała pod tym względem różnicę od słabiej zdegradowanego łańcucha. Zatem można założyć, że zmiana składu molowego wynikała z akumulacji niskocząsteczkowej frakcji kopolimeru w matrycy, a jego fluktuacje były związane z jej uwalnianiem do medium degradacyjnego.

16.1.6. Analiza zmian właściwości termicznych PCLTMC:PCL w czasie degradacji hydrolitycznej włókien

Metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej badano przebieg zmian temperatury zeszklenia (T_g) PCLTMC:PCL w czasie degradacji hydrolitycznej. Tak jak w przypadku włókien zawierających PDLGA, próbki analizowano w całości, bez rozdzielania frakcji biodegradowalnej od nieulegającej biodegradacji. Na wynik pomiaru wpływała zatem obecność wszystkich składników znajdujących się w materiale, zarówno poliuretanów, leków a także oligomerów powstających w czasie degradacji. Wartości T_g wyznaczone na poszczególnych etapach inkubacji w wodnym roztworze PBS przedstawiono w Tabela 44.

Tabela 44. Zmiany temperatury zeszklenia PCLTMC:PCL (90:10 % wag.) w czasie degradacji hydrolitycznej

Skład włókniny	Temperatura zeszklenia T_g [°C]							
	0	1	7	28	42	56	84	168
PCLTMC:PCL/0/D	-42	-42	-40	-40	-40	-41	-42	-40
PCLTMC:PCL /5/D	-38	-38	-39	-41	-40	-41	-41	-40
PCLTMC:PCL /Sil/0/D	-38	-38	-38	-39	-39	-39	-40	-38
PCLTMC:PCL /Sil/5/D	-37	-37	-37	-39	-37	-38	-39	-38
PCLTMC:PCL /Thane/0/D	-40	-40	-40	-41	-40	-40	-42	-43
PCLTMC:PCL /Thane/5/D	-39	-39	-40	-38	-39	-38	-40	-39
PCLTMC:PCL/Flex/0/D	-40	-39	-37	-36	-37	-36	-38	-39
PCLTMC:PCL/Flex/5/D	-38	-37	-37	-36	-38	-39	-37	-37

Wprowadzenie 10% wag. PCL (T_g -65 °C) do PCLTMC (T_g -38 °C) spowodowało obniżenie temperatury zeszklenia PCLTMC:PCL (T_g -42 °C) względem kopolimeru oraz wytworzenie pewnej ilości fazy krystalicznej, która miała za zadanie stabilizację kształtu mikrowłókien (Rys. 77).

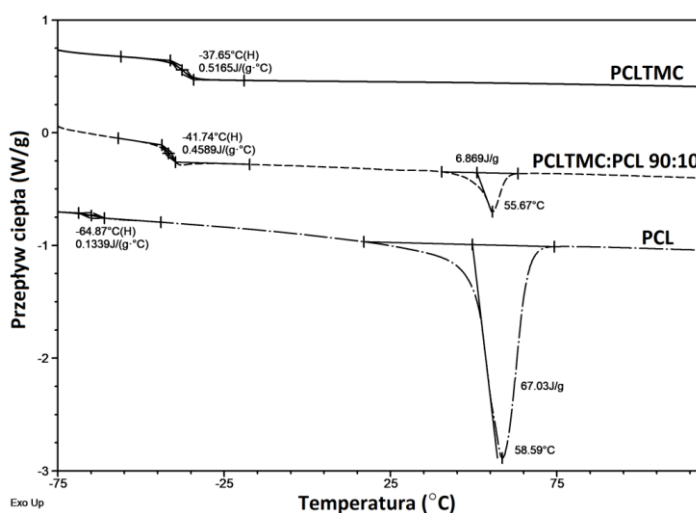
Świadczyło to o mieszalności obu polimerów w badanym zakresie udziałów wagowych i było zgodne z teoretycznie wartością T_g PCLTMC:PCL (90:10), obliczoną na podstawie równania Foxa (Równanie 41) [262].

$$\frac{1}{T_{g \text{ PCLTMC:PCL}}} = \frac{W_{\text{PCLTMC}}}{T_{g \text{ PCLTMC}}} + \frac{W_{\text{PCL}}}{T_{g \text{ PCL}}} \quad (41)$$

gdzie: W_{PCLTMC} – ułamek wagowy PCLTMC; W_{PCL} – ułamek wagowy PCL

Po przekształceniu otrzymano:

$$T_{g \text{ PCLTMC:PCL}} = \frac{T_{g \text{ PCLTMC}} \cdot T_{g \text{ PCL}}}{W_{\text{PCLTMC}} \cdot T_{g \text{ PCL}} + W_{\text{PCL}} \cdot T_{g \text{ PCLTMC}}} = \frac{235,5\text{K} \cdot 208,2\text{K}}{0,9 \cdot 208,2\text{K} + 0,1 \cdot 235,5\text{K}} = 232,5 \text{ K} = -41,60 \text{ }^\circ\text{C}$$



Rys. 77. Krzywe termiczne DSC przedstawiające wpływ wprowadzenia 10% wag. PCL do kopolimeru PCLTMC na temperaturę zeszklenia oraz krystaliczność otrzymanej mieszaniny

Po wprowadzeniu nanowłókien PCU do włókniny PCLTMC:PCL we wszystkich przypadkach zaobserwowano wzrost wyjściowej wartości T_g , świadczący o częściowej mieszalności obu komponentów. Przejście szkliste poliuretanów zachodziło w wyższych temperaturach niż PCLTMC:PCL, stąd taki kierunek zmian. Największe przesunięcie T_g wystąpiło w przypadku modyfikacji za pomocą nanowłókien ChronoSil (wzrost o 4 °C), pomimo najmniejszej różnicy temperatury zeszklenia pomiędzy tym polimerem, a PCLTMC:PCL (było to 12 °C). Stwierdzono więc, że kompatybilność tych polimerów była największa. W przypadku wprowadzenia nanowłókien HydroThane i ChronoFlex przesunięcie T_g było niższe (w obu przypadkach zanotowano wzrost o 2 °C), przy znacznie większych różnicach temperatury przejścia szklistego (odpowiednio 38 °C i 100 °C), co sugerowało znacznie mniejszą mieszalność termodynamiczną komponentów.

Wprowadzenie leków podobnie jak w przypadku PDLGA, spowodowało zmianę T_g PCLTMC:PCL przed degradacją. Przejście szkliste wszystkich materiałów zawierających nanowłókna modyfikatora wzrosło o 1-2 °C, natomiast w przypadku włókniny niezmodyfikowanej (PCLTMC:PCL/5/D) były to 4 °C. Wpływ substancji aktywnych był słabszy w próbkach zawierających nanowłókna PCU. Zarejestrowane zmiany T_g w początkowym okresie inkubacji nie mogą być jednoznacznie przypisane

do uwalniania leków, jednak ze względu na podnoszenie wartości temperatury zeszklenia musiały w pewnym stopniu oddziaływać z matrycą PCLTMC:PCL. Interakcje te były jednak słabsze niż w przypadku włókien, w których nośnikiem był kopoliester PDLGA (Rozdział 15.1.6 i Rozdział 15.2.6), co potwierdziła szybkość uwalniania sirolimusu, opisana w dalszej części pracy.

W czasie trwania eksperymentu, w żadnym ze zbadanych materiałów nie zaobserwowano jednoznacznych tendencji dotyczących zmian T_g PCLTMC:PCL. Fluktuacje temperatury zeszklenia świadczyły o złożoności procesu degradacji hydrolitycznej matrycy PCLTMC:PCL. Zmiany jednak nie były duże i zazwyczaj wynosiły 2-3 °C, a w przypadku włókniyny PCLTMC:PCL/Flex/0/D były to 4 °C, co stanowiło maksymalną wartość. Nie zaobserwowano także znaczącego wpływu uwalniania leków na przesunięcie T_g matrycy. Biorąc pod uwagę wszystkie dotychczasowe informacje stwierdzono, że zmiany właściwości termicznych mieszaniny PCLTMC:PCL w czasie inkubacji w wodnym roztworze PBSu miały kilka przyczyn. Część z nich spowodowała obniżenie, a część podwyższenie T_g . Głównymi czynnikami, od których zależała wartość temperatury zeszklenia były wzajemna szybkość powstawania i usuwania z matrycy niskocząsteczkowych produktów degradacji oraz średnia masa cząsteczkowa PCLTMC:PCL. Stosunek szybkości degradacji kopolimeru PCLTMC i homopolimeru PCL w mieszaninie również mógł wpływać na jej właściwości termiczne. Pomniejsze znaczenie miały zmiany składu molowego, które były stosunkowo niewielkie.

16.1.7. Wyznaczanie profili uwalniania leków

Sirolimus (SLM) oraz sól sodową diklofenaku (DiNa) uwalniano z frakcji PCLTMC:PCL (90:10% wag.) do wodnego roztworu PBS w temperaturze 37 °C. Początkowe stężenie każdego z leków w matrycy wynosiło 5% wag. Podobnie jak w przypadku eksperymentu uwalniania z włókien PDLGA, zaobserwowano, że hydrofilowość nanowłókien PCU wprowadzonych do włókniyny PCLTMC:PCL w roli modyfikatora miała istotny, choć nieco mniejszy wpływ na szybkość uwalniania substancji aktywnych. Wydajność enkapsulacji leków w matrycy przedstawiono w Tabeli 45.

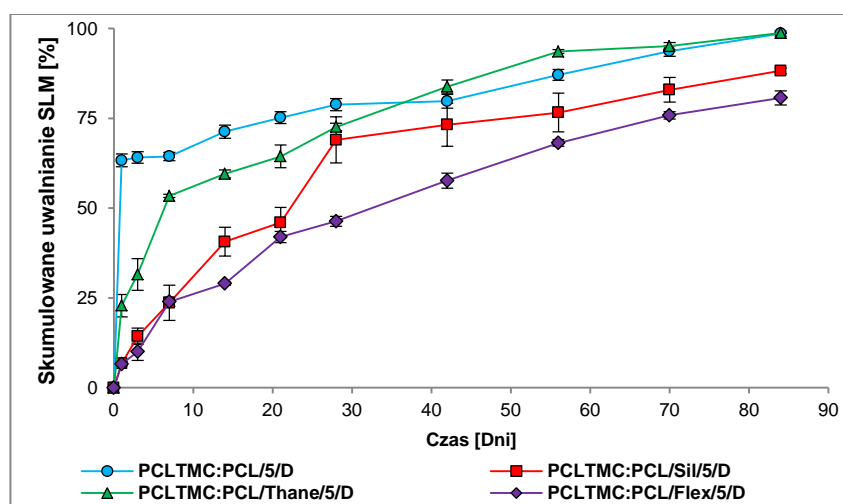
Tabela 45. Wydajność enkapsulacji leków wyrażona w μg leku przypadającą na 1 mg PCLTMC:PCL ($\bar{x}\pm\text{SD}$; N=5)

Skład włókniyny	Zawartość sirolimusu		
	$m_{\text{roztwór}} [\mu\text{g}/\text{mg}]$	$m_{\text{włókniyna}} [\mu\text{g}/\text{mg}]$	$W_{\text{enkapsulacji}}^* [\%]$
PCLTMC:PCL/5/D	52,14±0,81	50,74±0,59	97,31±0,58
PCLTMC:PCL/Sil/5/D	51,74±0,66	50,66±0,55	97,91±0,88
PCLTMC:PCL/Thane/5/D	51,99±0,59	50,71±0,46	97,54±0,63
PCLTMC:PCL/Flex/5/D	51,90±0,91	50,61±0,77	97,51±0,70
Skład włókniyny	Zawartość soli sodowej diklofenaku		
	$m_{\text{roztwór}} [\mu\text{g}/\text{mg}]$	$m_{\text{włókniyna}} [\mu\text{g}/\text{mg}]$	$W_{\text{enkapsulacji}}^* [\%]$
PCLTMC:PCL/5/D	52,51±0,62	50,13±0,81	95,47±0,91
PCLTMC:PCL/Sil/5/D	52,19±0,51	50,22±0,74	96,23±0,89
PCLTMC:PCL/Thane/5/D	52,55±0,47	50,71±0,75	96,50±0,72
PCLTMC:PCL/Flex/5/D	51,77±0,83	50,45±0,88	97,45±0,80

$m_{\text{roztwór}}$ – ilość leku przypadająca na 1 mg nośnika w roztworze; $m_{\text{włókniyna}}$ – ilość leku przypadająca na 1 mg nośnika we włókniynie; W_e – wydajność enkapsulacji wyrażona równaniem $W_e = (m_{\text{włókniyna}}/m_{\text{roztwór}}) \cdot 100$;

16.1.7.1. Wyznaczanie profili uwalniania sirolimusu (SLM)

Uwalnianie SLM z matrycy PCLTMC:PCL, nieoczekiwanie było znacznie szybsze od tego, które miało miejsce w przypadku włókien zawierających PDLGA, pomimo mniejszej powierzchni właściwej oraz większej hydrofobowości matrycy. W *Eksperymencie 3* zaobserwowano, że w czasie 84 dni, każdy z materiałów uwolnił co najmniej 85% wag. początkowej ilości rapamycyny (Rys. 78). Ponownie, szybkość procesu była największa dla materiału niezmodyfikowanego (PCLTMC:PCL/5/D), którego profil uwalniania charakteryzował występowaniem dwóch etapów. Już po 24 godzinach nastąpiło uwolnienie $63 \pm 2\%$ leku, co odpowiadało $32,10 \pm 1,78 \mu\text{g}$ SLM na 1 mg matrycy (dalej oznaczane jako $\mu\text{g}/\text{mg}$). Potencjalną przyczyną uwodnienia tak dużej ilości było nagromadzenie SLM blisko powierzchni włókien na skutek dyfuzji, już w czasie elektroprzędzenia. Prawdopodobnie, sirolimus słabo oddziaływał z nośnikiem i nie wykazywał w stosunku do niego kompatybilności. Następny etap charakteryzował się stopniowym uwalnianiem, zbliżonym do liniowego, w którym rolę zaczęła odgrywać dyfuzja leku przez matrycę. Po 84 dniach SLM uwolnił się niemal w całości ($99 \pm 1\%$), co odpowiadało $50,04 \pm 0,71 \mu\text{g}/\text{mg}$. Uzyskane dane empiryczne wykazywały zgodność z modelem Korsmeyera-Peppasa (Tabela 46). Wartość współczynnika uwalniania $n=0,07$ świadczyła o procesie kontrolowanym dyfuzyjnie (dyfuzja zgodna z prawami Ficka).



Rys. 78. Skumulowane uwalnianie SLM z włókien PCLTMC:PCL/PCU. Początkowe stężenie leku w nośniku wynosiło 5% wag. PCLTMC:PCL otrzymano z roztworów w DCM ($\bar{x} \pm \text{SD}$; N=3)

Wolniejszym uwalnianiem charakteryzował się materiał, do którego wprowadzono higroskopijny HydroThane. Po 7 dniach do medium inkubacyjnego uwolnione zostało $53 \pm 1\%$ początkowej ilości SLM, co odpowiadało $27,07 \pm 0,52 \mu\text{g}/\text{mg}$. W dalszej części eksperymentu proces transportu leku miał w dużej mierze liniowy charakter i odbywał się stosunkowo szybko, dlatego po 42 dniu sumaryczna ilość uwolnionego leku była nieco wyższa niż w przypadku materiału odniesienia. Różnice były jednak niewielkie. Ostatecznie, po 84 dniach niemal cała zawartość sirolimusu (ponad 99% wag.) została uwolniona do roztworu PBSu, co odpowiadało dawce $50,07 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$. Tak jak w przypadku włókny referencyjnej, najlepiej opisującą profil uwalniania SLM z materiału zawierającego nanowłókna HydroThane zależnością matematyczną był model Korsmeyera-Peppasa. Współczynnik

uwalniania $n=0,33$ świadczył o dyfuzyjnym charakterze procesu zgodnym z prawami Ficka, jednak w tym przypadku, wartości R_{adj}^2 dla pozostałych modeli były zdecydowanie wyższe, niż w uzyskane dla materiału PCLTMC:PCL/5/D, co mogło sugerować większy wpływ innych czynników na uwalnianie rapamycyny (degradacji, szybkości rozpuszczania leku i zmian jego stężenia w nośniku w czasie).

W przypadku próbek zawierających hydrofobowy ChronoSil, szybkość uwalniania sirolimusu była mniejsza. Profil uwalniania był w tym przypadku trójetapowy. Początkowa faza trwająca 21 dni charakteryzowała się uwalnianiem SLM zbliżonym do liniowego. W tym czasie do medium inkubacyjnego uwolniło się $46\pm 4\%$ leku ($23,30\pm 2,13$ $\mu\text{g}/\text{mg}$). Dzielne dawki wynosiły około $0,73$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. W czasie kolejnych 7 dni uwolniło się kolejne 23% rapamycyny, co dało sumarycznie $69\pm 6\%$ ($34,95\pm 3,25$ $\mu\text{g}/\text{mg}$). Przyspieszeniu uwalniania towarzyszyło zwiększenie dziennych dawek leku, które wynosiły około $1,66$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, zatem, szybkość uwalniania wzrosła o 127% . Następnie proces ponownie zwolnił. Lek uwalniał się powoli w sposób liniowy, aż do końca eksperymentu. Ostatecznie, po 84 dniach uwolniło się $88\pm 1\%$ SLM ($44,70\pm 0,38$ $\mu\text{g}/\text{mg}$), a uzyskane średnie dziennie dawki w trzeciej fazie wynosiły około $0,17$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. Odnosząc uzyskane wyniki do chłonności włókniny, można zaobserwować pewną korelację, gdyż w środkowym okresie eksperymentu ilość zaabsorbowanego medium degradacyjnego była najwyższa (Rys. 73). Porównując profil uwalniania rapamycyny z włókniny PCLTMC:PCL/Sil/5/D do wybranych modeli kinetycznych zaobserwowano, że nie wykazywał on dopasowania jedynie do modelu kinetyki uwalniania zerowego rzędu. Świadczyło to o złożoności procesu, w którym szybkość uwalniania SLM zależała od wielu czynników, zarówno gradientu stężenia leku w badanym układzie, czasu uwalniania, szybkości rozpuszczania, jak również procesów dyfuzyjnych (dyfuzja niezgodna z prawami Ficka $n=0,73$) i erozyjnych. Niemniej jednak, najwyższa wartość skorygowanego współczynnika determinacji R_{adj}^2 odpowiadała kinetyce pierwszego rzędu.

Tabela 46. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji R_{adj}^2 przedstawiające dopasowanie wybranych modeli kinetyki uwalniania leków do empirycznych profili uwalniania sirolimusu oraz stałe szybkości uwalniania (k)

Włóknina	Modele kinetyki uwalniania leku				
	0 rzędu	1 rzędu	Higuchiego	Hixona-Corwella	Korsmeyera-Peppasa
	$R_{adj}^2 (k_0)$	$R_{adj}^2 (k_1)$	$R_{adj}^2 (k_H)$	$R_{adj}^2 (k_{HC})$	$R_{adj}^2 (n; k_{KP})$
PCLTMC:PCL/5/D	0,4636 (0,641)	0,8139 (1,450)	0,6503 (7,073)	0,5487 (0,008)	0,9888 (0,07; 60,218)
PCLTMC:PCL/Sil/5/D	0,8345 (1,016)	0,9855 (0,044)	0,9637 (10,394)	0,9513 (0,008)	0,9779 (0,73; 5,749)
PCLTMC:PCL/Thane/5/D	0,7566 (0,969)	0,9070 (0,088)	0,9407 (10,229)	0,9199 (0,011)	0,9792 (0,33; 24,620)
PCLTMC:PCL/Flex/5/D	0,9204 (0,930)	0,9846 (0,031)	0,9942 (9,237)	0,9752 (0,005)	0,9827 (0,60; 6,478)

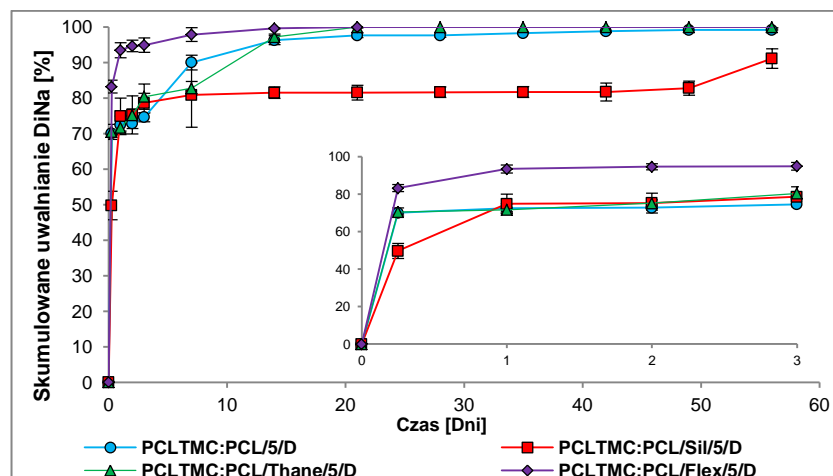
k_0 – stała szybkości uwalniania zerowego rzędu; k_1 - stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu; k_H - stała szybkości uwalniania Higuchiego; k_{HC} - stała szybkości uwalniania Hixona-Corwella; k_{KP} - stała szybkości uwalniania Korsmeyera-Peppasa; n – współczynnik uwalniania Korsmeyera-Peppasa;

Modyfikacja matrycy za pomocą nanowłókien najbardziej hydrofilowego poliuretanu ChronoFlex spowodowała dużo większe zmiany w przebiegu profilu uwalniania SLM, niż miało to miejsce w przypadku włókniny PDLGA. Wbrew założeniom, zaobserwowano najwolniejsze uwalnianie rapamycyny spośród wszystkich badanych materiałów, w których nośnikiem leku było PCLTMC:PCL. Uzyskany profil uwalniania bardzo dobrze odzwierciedlał model kinetyki pierwszego rzędu (R_{adj}^2 0,9846). Pomimo mniejszej szybkości procesu, uzyskano jednak bardziej równomierne średnie dawki leku w czasie pomiarów. Przyczyną mogło być wydłużenie drogi dyfuzji SLM po zapadnięciu się struktury matrycy, ze względu na obecność sztywnych nanowłókien ChronoFlex, które mogły stanowić mechaniczną barierę, uniemożliwiającą nadmierne uwolnienie leku w początkowym etapie z wolnych przestrzeni. Potwierdzeniem tego założenia jest wartość współczynnika $n=0,60$ obliczona na podstawie modelu Korsmeyera-Peppasa (R_{adj}^2 0,9827), odpowiadającemu dyfuzji anomalnej, niespełniającej praw Ficka. Pomimo tego, że proces uwalniania SLM zachodził wolniej, jego końcowa ilość, która została przetransportowana do medium inkubacyjnego była zadowalająca. W czasie 84 dni uwolniło się $81\pm 2\%$ ($41,27\pm 1,99$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) leku. Profil uwalniania SLM z materiału zmodyfikowanego za pomocą nanowłókien ChronoFlex był zgodny z wszystkimi rozpatrywanymi modelami matematycznymi, z wyjątkiem modelu kinetyki uwalniania zerowego rzędu. Zatem, również w tym przypadku proces był skomplikowany i zależał od wielu czynników. Najlepsze dopasowanie uzyskano z modelem Higuchiego, co potwierdzało kluczowy wpływ procesów dyfuzyjnych na szybkość uwalniania sirolimusu.

Wprowadzenie nanowłókien poliuretanowych, niezależnie od ich hydrofilowości zmniejszyło szybkość uwalniania sirolimusu w początkowej fazie inkubacji, w porównaniu do materiału referencyjnego. Dzięki zastosowaniu przeplotu włókien nośnika leku i PCU ograniczono w pewnym stopniu dostępność leku z powierzchni materiału oraz szybkość dyfuzji, co pozwoliło na uzyskanie bardziej równomiernych średnich dawek SLM. Wzrost szybkości uwalniania SLM z matrycy PCLTMC:PCL, w porównaniu do PDLGA, pomimo mniejszej powierzchni właściwej oraz większej hydrofobowości nośnika, wynikał prawdopodobnie z kilku przyczyn. Pierwszą z nich mogły być słabsze oddziaływania międzycząsteczkowe pomiędzy lekiem a polimerem, przez co jego dyfuzja do otoczenia zachodziła łatwiej. Druga mogła wynikać z bardzo niskiej temperatury zeszklenia PCLTMC:PCL (-42 °C). Inkubacja miała miejsce w warunkach temperatury o ponad 70 °C wyższej niż T_g , zatem, w przeciwieństwie do PDLGA, mieszanina PCLTMC:PCL znajdowała się w stanie lepkosprężystym w 37 °C. Większa ruchliwość łańcuchów polimerowych w czasie uwalniania sprzyjała dyfuzji leków do otoczenia. Ponadto, sirolimus ze względu na słabe powinowactwo do matrycy mógł się wytrącać na powierzchni polimeru już podczas procesu elektroprzędzenia, skracając drogę dyfuzji do roztworu PBS. Ze względu na to, że uzyskane dla rapamycyny profile uwalniania dość słabo korelowały z chłonnością wody, takie wyjaśnienie tłumaczy uwolnienie $63\pm 2\%$ SLM już po 24 godzinach z próbki PCLTMC:PCL/5/D. Zatem, poliuretanowe nanowłókna mogły również działać jako fizyczna przeszkoda, wydłużająca drogę lub zwiększająca opory dyfuzji SLM do otoczenia, dlatego odnotowano mniejszą szybkość uwalniania leku w początkowej fazie. W *Eksperymencie 3* modyfikatory PCU w mniejszym stopniu wpływały na całkowitą ilość uwolnionej rapamycyny, zmieniając jedynie kinetykę procesu na jego poszczególnych etapach.

16.1.7.2. Wyznaczanie profili uwalniania soli sodowej diklofenaku (DiNa)

Dobrze rozpuszczalna sól sodowa diklofenaku uwalniała się bardzo szybko z matrycy PCLTMC:PCL (90:10), niezależnie od modyfikacji materiału (Rys. 79). We wszystkich przypadkach nastąpiło szybkie uwolnienie leku w czasie 24 godzin. Dodatkowy pomiar przeprowadzony po 6 godzinach pokazał, że nanowłókna PCU o danej hydrofilowości miały kluczowe znaczenie w pierwszej dobie procesu uwalniania łatwo rozpuszczalnego DiNa.



Rys. 79. Skumulowane uwalnianie DiNa z włókien PCLTMC:PCL/PCU. Początkowe stężenie leku w nośniku wynosiło 5% wag. PCLTMC:PCL otrzymano z roztworów w DCM ($\bar{x}\pm SD$; N=3)

Zaobserwowano, że w porównaniu do pozostałych modyfikatorów, hydrofobowy ChronoSil najbardziej spowolnił transport leku do medium inkubacyjnego. Po 6 godzinach z włókieny PCLTMC:PCL/Sil/5/D uwolniło się $50\pm 4\%$ DiNa ($24,99\pm 2,02 \mu\text{g}/\text{mg}$), a początkowa faza procesu zakończyła się po 24 godzinach, kiedy uwolnione zostało $75\pm 5\%$ ($37,62\pm 2,57 \mu\text{g}/\text{mg}$). W dalszym etapie eksperymentu nastąpiło spowolnienie uwalniania, a po 7 dniach niemal zatrzymanie, trwające do 49 dnia. W tym czasie ilość uwolnionego z DiNa wzrosła o 2% wag. z $81\pm 9\%$ do $83\pm 2\%$. Następnie, lek ponownie zaczął się uwalniać osiągając wartość $91\pm 3\%$ ($41,05\pm 0,76 \mu\text{g}/\text{mg}$) po 56 dniach, kiedy to zakończono obserwację. Uzyskany efekt mógł wynikać z wprowadzenia do dość hydrofobowej matrycy, drugiego hydrofobowego czynnika, jakim były nanowłókna ChronoSil, które oprócz utrudniania wnikania wody do wnętrza materiału, ze względu na małe powinowactwo do środowiska inkubacji, stanowiły w pewnym stopniu mechaniczną przeszkodę dla leku podczas procesów dyfuzyjnych. Efekt modyfikatora był zatem taki sam jak w przypadku uwalniania SLM, jednak nastąpił w nieco innej skali czasowej, ze względu na znaczne różnice w rozpuszczalności substancji aktywnych.

Włókieny PDLTMC:PCL/5/D oraz PCLTMC:PCL/Thane/5/D wykazywały niemal taki sam przebieg profili uwalniania w całym okresie prowadzenia pomiarów. Pierwsza faza uwalniania w obu przypadkach zakończyła się po 6 godzinach. Ilość uwolnionego DiNa z włókieny referencyjnej wynosiła $70\pm 1\%$ ($35,12\pm 0,27 \mu\text{g}/\text{mg}$) oraz $71\pm 2\%$ ($35,76\pm 1,09 \mu\text{g}/\text{mg}$) z materiału zmodyfikowanego nanowłóknami HydroThane. W drugim etapie przyrost ilości uwolnionego DiNa był niewielki i zależał od szybkości dyfuzji leku przez matrycę. W przypadku materiału PCLTMC:PCL/Thane/5/D uwalnianie

zakończyło się po 21 dniach ($50,71 \pm 0,11$ µg/mg). W tym samym czasie włóknina PCLTMC:PCL/5/D uwolniła około 98% początkowej ilości DiNa, a po 56 dniach o 1% wag. więcej ($49,29 \pm 0,06$ µg/mg).

Sól sodowa diklofenaku najszybciej uwalniała się z włókniny zmodyfikowanej nanowłóknami najbardziej hydrofilowego poliuretanu – ChronoFlex (stała szybkości Korsmeyera-Peppasa $k_{KP}=90,768$). W tym przypadku etap początkowy również zakończył się po 6 godzinach, z uwalnianiem na poziomie $83 \pm 2\%$ ($42,01 \pm 0,92$ µg/mg). Po tygodniu było to $98 \pm 2\%$ ($49,39 \pm 0,97$ µg/mg), a koniec procesu uwalniania nastąpił w tym przypadku po 14 dniach ($50,45 \pm 0,01$ µg/mg).

Wartości skorygowanego współczynnika determinacji R_{adj}^2 dla wszystkich zbadanych włókien odpowiadały kinetyce uwalniania zgodnej z modelem Korsmeyera-Peppasa. Współczynnik $n < 0,5$ świadczył o procesie uwalniania limitowanym szybkością dyfuzji spełniającej prawa Ficka. Dopasowanie do pozostałych modeli było niewystarczające, aby rozpatrywać ich sens fizyczny. Wyjątek stanowiła włóknina zawierająca modyfikator w postaci nanowłókien ChronoFlex, która wykazywała również zgodność z kinetyką uwalniania pierwszego rzędu ($R_{adj}^2=0,9881$), co świadczyło o zależności od gradientu stężeń w obrębie badanego układu matryca-medium oraz czasu uwalniania.

Tabela 47. Wartości skorygowanego współczynnika determinacji R_{adj}^2 przedstawiające dopasowanie wybranych modeli kinetyki uwalniania leków do empirycznych profili uwalniania DiNa oraz stałe szybkości uwalniania (k)

Włóknina	Modele kinetyki uwalniania leku				
	0 rzędu	1 rzędu	Higuchiego	Hixona-Corwella	Korsmeyera-Peppasa
	$R_{adj}^2 (k_0)$	$R_{adj}^2 (k_1)$	$R_{adj}^2 (k_H)$	$R_{adj}^2 (k_{HC})$	$R_{adj}^2 (n; k_{KP})$
PCLTMC:PCL/5/D	0,2924 (1,831)	0,7006 (4,286)	0,5142 (12,366)	0,5038 (0,043)	0,9785 (0,07; 73,248)
PCLTMC:PCL/Sil/5/D	0,1186 (1,269)	0,5707 (1,469)	0,3455 (9,533)	0,2250 (0,038)	0,9660 (0,12; 67,237)
PCLTMC:PCL/Thane/5/D	0,3107 (1,883)	0,7269 (4,348)	0,5249 (12,571)	0,4942 (0,043)	0,9962 (0,05; 74,125)
PCLTMC:PCL/Flex/5/D	0,0541 (1,309)	0,9881 (4,348)	0,2406 (10,050)	0,2192 (0,042)	0,9962 (0,05; 90,786)

k_0 – stała szybkości uwalniania zerowego rzędu; k_1 - stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu; k_H - stała szybkości uwalniania Higuchiego; k_{HC} - stała szybkości uwalniania Hixona-Corwella; k_{KP} - stała szybkości uwalniania Korsmeyera-Peppasa; n – współczynnik uwalniania Korsmeyera-Peppasa;

Porównując uwalnianie DiNa z matrycy PCLTMC:PCL do uzyskanego dla PDLGA można było zaobserwować te same tendencje – mała różnica pomiędzy przebiegiem profilu uwalniania włókniny niezmodyfikowanej, a włókniny zawierającej HydroThane, oraz nieco wolniej uwalniający materiał do którego wprowadzono nanowłókna ChronoSil. Jedyne różnice zaobserwowano w przypadku modyfikatora ChronoFlex, który przyspieszył uwalnianie z matrycy PCLTMC:PCL, w czasie gdy dla nośnika PDLGA uzyskano nieco wolniejsze uwalnianie niż w materiałach PDLGA/5/D i PDLGA/Thane/5/D. W przypadku matrycy PCLTMC:PCL o większej hydrofobowości, w pierwszej fazie procesu uwolnić się więcej leku. Świadczyło to prawdopodobnie o jego akumulacji na powierzchni polimeru. W drugiej, wolniejszej fazie uwalniania, DiNa szybciej uwalniał się z matrycy

PDLGA. Prawdopodobnie nie wynikało to z mniejszych oporów dyfuzyjnych, ponieważ kopoliester PDLGA w temperaturze prowadzenia eksperymentu (37 °C) znajdował się w stanie szklistym. Przyczyną była głównie krótsza drogi dyfuzji, będąca rezultatem wysokiego stosunku powierzchni do objętości włókien PDLGA/PCU, w porównaniu do zwartej matrycy PCLTMC:PCL, a także wyższa siła napędowa transportu DiNa, gdyż po pierwszym etapie uwalniania zostało więcej leku w matrycy.

16.1.8. Analiza zmian właściwości mechanicznych włókien PCLTMC:PCL/PCU w czasie degradacji hydrolitycznej

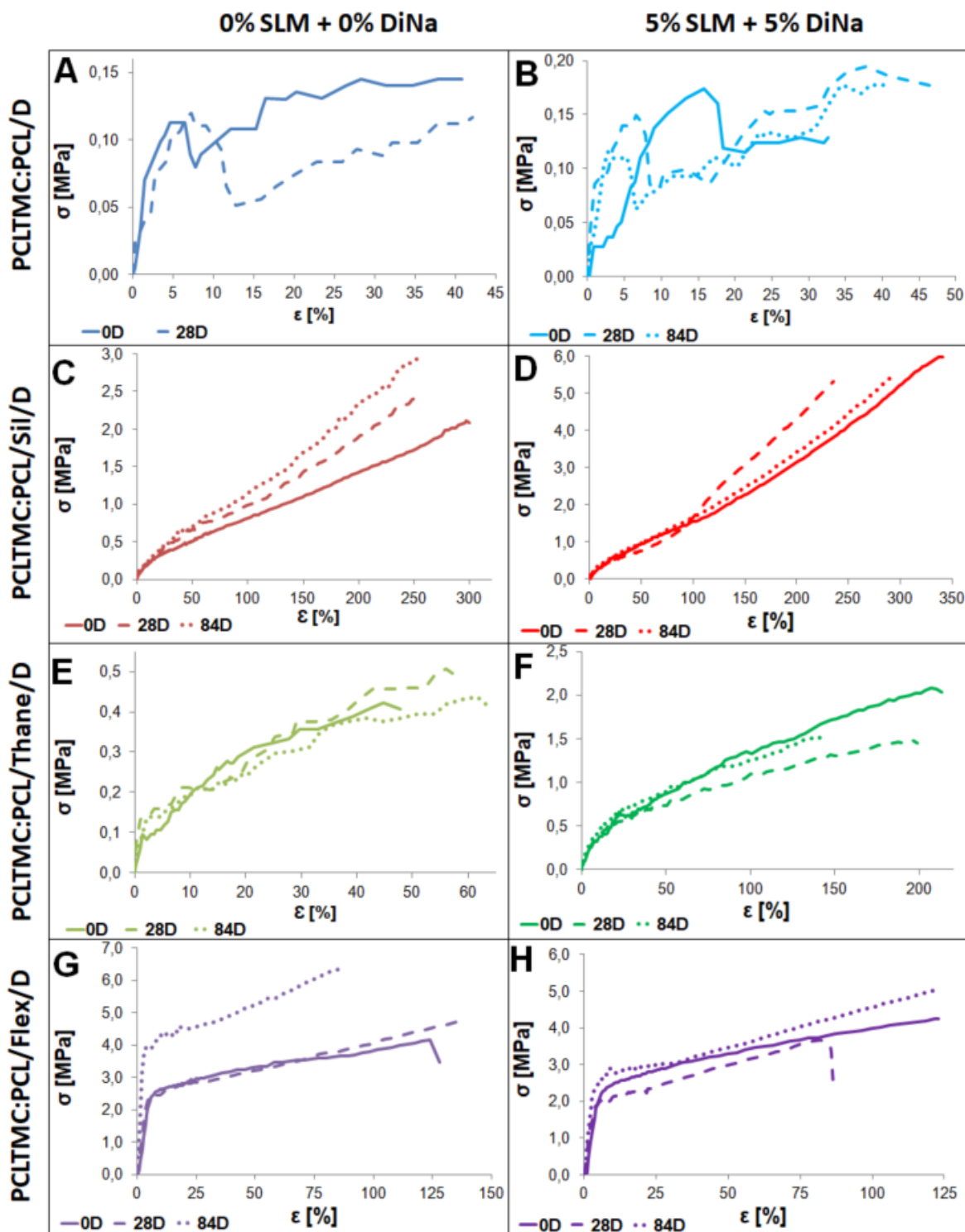
Na podstawie analizy krzywych zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ), wyznaczono wytrzymałość na rozciąganie σ_{\max} [MPa], parametry na granicy sprężystości (plastyczności) (σ_y [MPa] i ϵ_y [%]) oraz wartości naprężenia przy 25%, 50% i 100% odkształcenia (Tabela 48) podczas degradacji hydrolitycznej włókien PCLTMC:PCL zmodyfikowanych nanowłóknami PCU.

Zaobserwowano, że właściwości mechaniczne włókien PCLTMC:PCL były niewielkie, co wynikało z niskiej temperatury zeszklenia (-42 °C) i głównie amorficznej struktury mieszaniny. Temperatura pomiaru wynosiła 37 °C, zatem polimer znajdował się wtedy w stanie lepkosprężystym i posiadał bardzo małą wytrzymałość na rozciąganie, wynoszącą jedynie $0,15 \pm 0,02$ MPa. Po 28 dniach degradacji pomimo podobnego przebiegu krzywych rozciągania do granicy sprężystości, ostatecznie na skutek postępu degradacji materiał wykazywał spadek własności mechanicznych. Spowodowało to obniżenie wytrzymałości na rozciąganie, jednak różnice były niewielkie (Rys. 80A). Nie udało się przeprowadzić pomiaru po 84 dniach, ze względu na uszkodzenia zdegradowanych próbek podczas montażu w uchwytach maszyny wytrzymałościowej. Wprowadzenie leków do matrycy PCLTMC:PCL zwiększyło wytrzymałość na granicy sprężystości o 55%, a wytrzymałość na rozciąganie o 20%, jednak przy tak niskich wartościach miało to małe znaczenie (Tabela 48). Chociaż właściwości mechaniczne nie uległy zbytniej poprawie, to jednak możliwe było przeprowadzenie pomiarów po 84 dniach (Rys. 80B). Potwierdzało to wcześniej sformułowaną tezę (Rozdział 15.1.8) o stabilizującym właściwości mechaniczne dodatku sirolimusu, dzięki hydrofobizacji matrycy. Prawdopodobnie wpływ rapamycyny był w tym przypadku znacznie mniejszy niż dla PDLGA, ze względu na szybsze uwalnianie tego leku. Dużą rolę w stabilizacji właściwości mechanicznych włókien zawierających PCLTMC:PCL miało zwiększenie gęstości objętościowej próbek, związane ze zmniejszaniem się objętości wolnych przestrzeni pomiędzy włóknami, na skutek zapadania się struktury w temperaturze inkubacji. Zaletą PCLTMC:PCL był brak wzrostu sztywności materiału, który nie kruszył się jak PDLGA, dzięki czemu włókieny zachowały elastyczność w czasie całego eksperymentu. Niemniej jednak, rola tego polimeru przy przenoszeniu naprężeń w próbkach dwukomponentowych (PCLTMC:PCL/PCU) była znikoma, ze względu na niskie parametry wytrzymałościowe, wynikające z lepkosprężystych właściwości mieszanki PCLTMC:PCL w temperaturze 37 °C, w której prowadzono statyczną próbę rozciągania.

Tabela 48. Zmiany właściwości mechanicznych włókien zmierzone w czasie inkubacji ($\bar{x}\pm SD$; N=3)

Etap degradacji	Parametr	Oznaczenie włókniny									
		/O/D	/5/D	/SI/0/D	/SI/5/D	/Thane/0/D	/Thane/5/D	/Flex/0/D	/Flex/5/D		
Dzień 0	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	0,14±0,01	0,12±0,02	0,36±0,04	0,68±0,09	0,32±0,04	0,62±0,04	2,95±0,22	2,54±0,17		
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	zerwanie	zerwanie	0,50±0,04	0,94±0,08	0,36±0,03	0,87±0,07	3,32±0,28	2,92±0,21		
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	zerwanie	zerwanie	0,81±0,06	1,55±0,10	zerwanie	1,34±0,09	3,82±0,20	3,52±0,35		
	σ_{max} [MPa]	0,15±0,02	0,18±0,02	2,10±0,01	5,88±0,16	0,35±0,10	2,06±0,03	3,72±0,62	3,99±0,38		
	(ϵ_{cmax}) [%]	(41,05±2,11)	(16,03±1,54)	(295,13±4,42)	(308,86±43,31)	(36,69±15,54)	(193,96±25,53)	(98,15±36,10)	(121,10±3,11)		
	σ_y [MPa]	0,11±0,01	0,17±0,02	Nie	Nie	Nie	Nie	2,46±0,25	2,43±0,21		
Dzień 28	(ϵ_y) [%]	(4,58±0,23)	(15,83±1,87)	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	(10,03±0,43)	(13,80±0,46)		
	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	0,08±0,01	0,15±0,02	0,40±0,04	0,53±0,05	0,33±0,02	0,58±0,05	2,85±0,18	2,40±0,20		
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	zerwanie	zerwanie	0,63±0,03	0,75±0,09	0,45±0,04	0,74±0,06	3,23±0,24	2,99±0,24		
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	zerwanie	zerwanie	1,04±0,08	1,58±0,13	zerwanie	1,09±0,06	4,09±0,31	zerwanie		
	σ_{max} [MPa]	0,13±0,01	0,19±0,02	2,47 ±0,01	5,22±0,16	0,44±0,10	1,46±0,04	4,69±0,14	3,32±0,51		
	(ϵ_{cmax}) [%]	(42,35±2,41)	(38,03±2,97)	(259,36±2,23)	(238,00±2,40)	(45,11±15,36)	(160,65±49,99)	(142,13±4,95)	(89,68±8,56)		
Dzień 84	σ_y [MPa]	0,12±0,01	0,15±0,01	Nie	Nie	Nie	Nie	2,61±0,16	1,93±0,13		
	(ϵ_y) [%]	(6,52±0,34)	(6,56±0,41)	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	(11,81±6,58)	(5,62±0,45)		
	$\sigma(\epsilon 25\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	0,13±0,01	0,48±0,03	0,63±0,06	0,29±0,01	0,69±0,04	4,58±0,23	2,98±0,16		
	$\sigma(\epsilon 50\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	zerwanie	0,70±0,06	0,96±0,11	0,39±0,04	0,89±0,03	5,38±0,28	3,47±0,26		
	$\sigma(\epsilon 100\%)$ [MPa]	Brak pomiaru**	zerwanie	1,12±0,07	1,66±0,12	zerwanie	1,26±0,09	zerwanie	4,56±0,29		
	σ_{max} [MPa]	Brak pomiaru**	0,18±0,01	2,71±0,37	5,23±0,36	0,42±0,03	1,46±0,09	5,40±1,41	5,04±0,66		
Dzień 84	(ϵ_{cmax}) [%]	(40,70±2,73)	(40,70±2,73)	(245,76±14,49)	(280,59±18,22)	(52,28±10,22)	(124,07±23,92)	(91,29±5,14)	(123,28±4,77)		
	σ_y [MPa]	Brak pomiaru**	0,11±0,01	Nie	Nie	Nie	Nie	3,67±0,28	2,99±0,18		
	(ϵ_y) [%]	(5,28±0,36)	(5,28±0,36)	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	zaobserwowano	(16,45±1,46)	(19,10±0,87)		

$\sigma(\epsilon 25\%)/(\epsilon 50\%)/(\epsilon 100\%)$ – naprężenie przy odkształceniu 25%/50%/100%; σ_{max} - wytrzymałość na rozciąganie; ϵ_{cmax} – odkształcenie odpowiadające maksymalnej wartości naprężenia; σ_y – naprężenie na granicy sprężystości; ϵ_y odkształcenie na granicy sprężystości
 *Brak zerwania próbki w zakresie pomiarowym ograniczonym wymiarami komory środowiskowej. **Próbki zbyt kruche na skutek procesu degradacji – uległy uszkodzeniu podczas montażu w uchwytych maszyny wytrzymałościowej.



Rys. 80. Przykładowe krzywe zależności naprężenia (σ) od odkształcenia (ϵ) obrazujące przebieg zmian właściwości mechanicznych w czasie inkubacji, wyznaczone w statycznej próbie rozciągania

Wprowadzenie nanowłókien ChronoSil i HydroThane do włókien PCLTMC:PCL dało podobny efekt, przejawiający się wzrostem wytrzymałości na rozciąganie oraz poprawą zdolności do odkształcania materiału. Skala zmian była jednak inna w zależności od użytego PCU, ze względu na różne średnice otrzymanych nanowłókien. Właściwości mechaniczne obu poliuretanów były bowiem zbliżone w badanym zakresie odkształceń (Rys. 46). ChronoSil ze względu na dwukrotnie większe

średnice włókien, spowodował znaczny wzrost wytrzymałości na rozciąganie ($2,10 \pm 0,01$ MPa) oraz elastyczności włókniny. W przypadku HydroThane wpływ na właściwości mechaniczne był mniejszy (Tabela 48). Wytrzymałość na rozciąganie wyniosła $0,35 \pm 0,10$ MPa, a zdolność do odkształcania wzrosła około dwukrotnie w stosunku do niezmodyfikowanej próbki PCLTMC:PCL/0/D. W czasie pomiaru, we włókninie zawierającej ChronoSil zaobserwowano silną tendencję do orientacji materiału, a także wzrost wytrzymałości na rozciąganie przy niewielkim spadku elastyczności podczas inkubacji. Przyczyną było wspomniane zapadnięcie się struktury skutkujące zmniejszeniem objętości wolnych przestrzeni, co przejawiało się wzrostem gęstości objętościowej. Potwierdzał to również niewielki wzrost naprężeń w zakresie odkształceń do 100% po 28 i 84 dniach (Rys. 80C). Degradacja odgrywała w tym przypadku drugorzędną rolę, ponieważ frakcja PCLTMC:PCL wykazywała znikome parametry wytrzymałościowe. Takie same obserwacje miały miejsce w przypadku włókniny PCLTMC:PCL/Thane/0/D, przy czym zmiany które pojawiły się na skutek inkubacji próbek były mniejsze, niż w poprzednim wariancie modyfikacji materiału (Rys. 80E). W obu przypadkach nie zaobserwowano granicy sprężystości, a próbki wykazywały charakterystykę zależności naprężenia od odkształcenia odpowiadającą elastomerom. We włókninach, do których wprowadzono leki nastąpił znaczny wzrost wytrzymałości na rozciąganie do $5,88 \pm 0,16$ MPa i $2,06 \pm 0,03$ MPa odpowiednio dla modyfikacji nanowłóknami ChronoSil (Rys. 80D) i HydroThane (Rys. 80F). Również naprężenia w zakresie do 100% odkształcenia były w obu przypadkach około dwa razy większe. Wzrosła także elastyczność, szczególnie w przypadku materiału PCLTMC:PCL/Thane/5/D, jednak na skutek uwalniania leków, zdolność do maksymalnego odkształcania zmniejszyła się. Ponieważ wytrzymałość mechaniczna mieszaniny PCLTMC:PCL była niewielka, trudno jest uznać, że wzmocnienie próbek nastąpiło jedynie poprzez samą obecność leku w nośniku. Wchłonięcie pewnej ilości wody, o ile mogło wpłynąć na wzrost maksymalnego odkształcenia materiału, to powinno raczej spowodować obniżenie wytrzymałości na rozciąganie, ze względu na plastyfikację. Warto zauważyć, że włókniny zawierające leki wykazywały najwyższą wartość naprężenia w momencie przed zerwaniem materiału, przy jego silnej orientacji na skutek rozciągnięcia. Dla mniejszych odkształceń, w dalszym ciągu posiadały wyższe wartości naprężeń w stosunku do swoich odpowiedników nie zawierających substancji aktywnych. Zaobserwowany efekt nie został jednak wyjaśniony na obecnym etapie przeprowadzonych prac.

Osobną kwestią do omówienia była modyfikacja włókniny PCLTMC:PCL za pomocą najbardziej wytrzymałego PCU – ChronoFlexu. Jako jedyny poliuretan wykazywał on T_g wyższe, niż temperatura inkubacji, a także wyraźną granicę sprężystości, co znalazło swoje odzwierciedlenie w przebiegu krzywych rozciągania (Rys. 80G). Wytrzymałość na rozciąganie w materiale PCLTMC:PCL/Flex/0/D wyniosła $3,72 \pm 0,62$ MPa, co było wartością niższą niż uzyskana dla PCLTMC:PCL/Sil/5/D. Jednak włókniny zawierające ChronoFlex nie miały tendencji do orientowania się w kierunku rozciągania, a dzięki właściwościom sprężystym (odcinek do granicy sprężystości), wykazywały o wiele silniejszą reakcję na działanie przyłożonej siły już przy niedużych odkształceniach. Przykładowo, naprężenie przy 25% odkształcenia było 8 razy większe niż we włókninie zawierającej ChronoSil i 9 razy większe od występującego w próbkach, do których wprowadzono HydroThane (Tabela 48). W przypadku materiału niezawierającego leków, właściwości nie uległy większym zmianom po 28 dniach inkubacji.

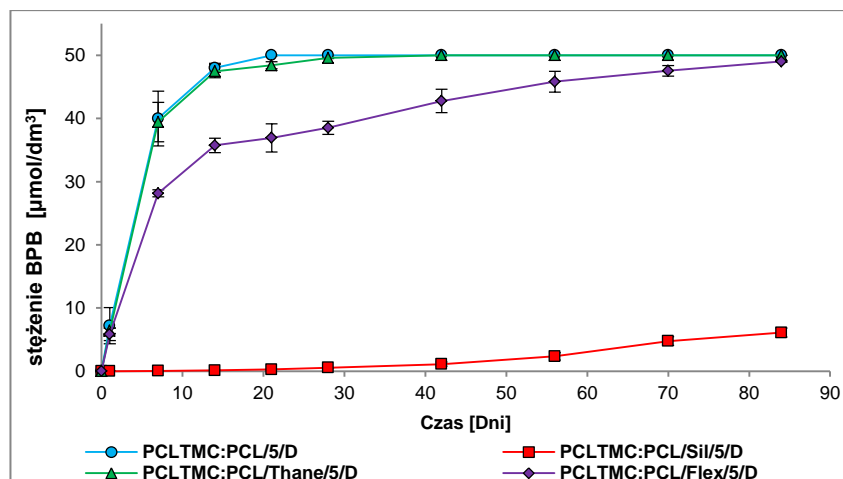
Po 84 dniach zaobserwowano wzrost σ_{\max} do wartości $5,40 \pm 1,41$ MPa, wynikający prawdopodobnie ze wzrostu gęstości objętościowej próbki (niewielki skurcz) oraz krystalizacji w obrębie nanowłókien ChronoFlex (Rys. 30). W omawianym przypadku, wprowadzenie leków w niewielkim stopniu obniżyło właściwości mechaniczne przed degradacją. Natomiast w jej trakcie zaobserwowano nieco większą stabilizację, gdyż po 84 dniach krzywe rozciągania przebiegały tylko przy nieco wyższych wartościach naprężenia, szczególnie dla odkształceń poniżej 100%. Włókny zawierające ChronoFlex były sztywniejsze niż te, do których wprowadzono ChronoSil i HydroThane, niemniej jednak zachowały zadowalającą elastyczność przez cały czas degradacji przy znacznie lepszych właściwościach mechanicznych pod kątem potencjalnego zastosowania w leczeniu przepuklin.

Wprowadzenie przepłotu nanowłókien PCU do włókny PCLTMC:PCL spowodowało znacznie większe zmiany wytrzymałości mechanicznej niż w przypadku kopoliestru PDLGA, który w przeciwieństwie do mieszaniny polimerów, mógł stanowić samonośną włókninę. Jak można zauważyć, wytrzymałość na rozciąganie oraz elastyczność zależały niemal wyłącznie od właściwości i średnic nanowłókien zastosowanego modyfikatora poliuretanowego. Ze względu na niewielki wpływ frakcji ulegającej degradacji hydrolitycznej, zmiany jakie zaobserwowano w trakcie tego procesu nie były duże i stanowiły wypadkową wzrostu gęstości objętościowej materiału wynikającej z zapadnięcia się struktury włókny w trakcie inkubacji oraz z absorpcji pewnej ilości wody, gdyż pomiarów dokonywano na mokrych włókninach, bezpośrednio po wyjęciu próbek z roztworu PBS.

16.1.9. Badanie przenikania barwnika przez wewnętrzną membranę PCU włóknin

Wykorzystując metodę opisaną w Rozdziale 11.12 badano szybkość przenikania modelowego barwnika – błękitu bromofenolowego (BPB) przez włókny zawierające przepłot PCLTMC:PCL i nanowłókien PCU o różnej hydrofilowości. W rdzeniu każdej z nich na etapie wytwarzania, za pomocą elektrorozpylenia wytworzono litą, poliuretanową membranę. Założeniem jej działania, było zahamowanie transportu leków z jednej strony materiału na drugą. Zmiany ilości barwnika w komorze pomiarowej urządzenia w czasie prowadzenia pomiarów przedstawiono na Rys. 81. Wyznaczone na podstawie stężenia BPB w nadawie i permeacie wartości współczynnika retencji (R) przedstawiono w Tabeli 49.

Zaobserwowano, że matryca PCLTMC:PCL pomimo swojej hydrofobowości, w niewielkim stopniu ograniczała przenikanie barwnika. Współczynnik retencji (R) zmniejszał swoją wartość bardzo szybko, z 0,92 po 1 dniu do 0,33 po 7 dniach i 0,08 po 14 dniach. Wyrównanie stężeń pomiędzy komorą zawierającą wodny roztwór BPB w buforze PBS, a komorą zawierającą czysty roztwór PBS nastąpiło po 21 dniach. Uzyskany wynik mógł być skutkiem bardzo niskiej wartości T_g PCLTMC:PCL, przez co materiał ten w temperaturze inkubacji znajdował się w stanie lepkosprężystym o niższej gęstości. Niemniej jednak, przenikanie barwnika przez matrycę PCLTMC:PCL/5/D było wolniejsze, niż w przypadku PDLGA/5/D (Rozdział 15.2.9), ze względu na szybkie zapadnięcie się struktury włókny w temperaturze inkubacji, a także większą hydrofobowość. Można podejrzewać, że w przypadku próbki PDLGA/5/D, wyrównanie stężeń pomiędzy nadawą a permeatem nastąpiło szybciej niż wystąpiło uszczelnienie jej powierzchni wynikające ze skurczu.



Rys. 81. Zależność stężenia roztworu barwnika BPB w komorze pomiarowej od czasu ($\bar{x} \pm SD$; N=2)

Tabela 49. Zmiany współczynnika retencji (R) włókien, względem BPB w czasie inkubacji, wyznaczone na podstawie średnich stężeń barwnika w nadawie i permeacie

Czas [Dni]	R [-]		R [-]	
	PCLTMC:PCL	PCLTMC:PCL/Sil/5/D	PCLTMC:PCL/Thane/5/D	PCLTMC:PCL/Flex/5/D
1	0,92	1,00	0,93	0,94
7	0,33	1,00	0,35	0,61
14	0,08	1,00	0,10	0,44
21	0,00	1,00	0,06	0,41
28	0,00	0,99	0,02	0,37
42	0,00	0,99	0,00	0,25
56	0,00	0,98	0,00	0,15
70	0,00	0,95	0,00	0,09
84	0,00	0,93	0,00	0,04

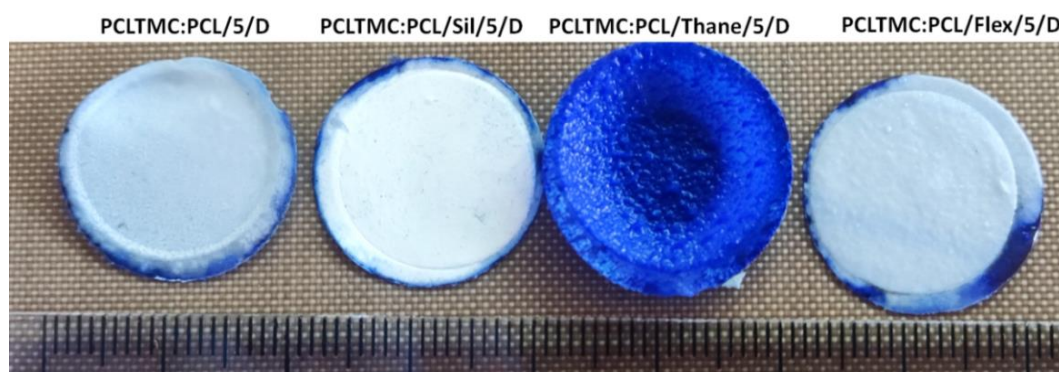
Włóknina, do której wprowadzono modyfikator w postaci HydroThane, ze względu na największą chłonność wody oraz higroskopijność, wykazywała niemal takie same parametry jak materiał odniesienia. Wyrównanie stężeń w tym przypadku nastąpiło po 28 dniach, ale już po tygodniu ilość BPB w permeacie wynosiła $39,44 \pm 3,11$ $\mu\text{mol/l}$. Wynik ten był zbliżony do uzyskanego dla próbki PDLGA/Thane/5/D (Rys. 66). Podobnie jak w *Eksperymencie 2*, włóknina ta ze względu na higroskopijne właściwości HydroThane wykazywała silną interakcję z roztworem barwnika o czym świadczyło jej intensywne zabarwienie (Rys. 82)

Wprowadzenie membrany ChronoFlex podobnie jak w przypadku materiału PDLGA/Flex/5/D spowodowało zmniejszenie szybkości transportu BPB przez strukturę włókniny. Ze względu na wolniejsze przenikanie barwnika przez matrycę PCLTMC:PCL, spodziewano się uzyskania nieco wyższych wartości współczynnika retencji niż w *Eksperymencie 2*, co nie zostało zaobserwowane. Stężenia nadawy i permeatu w tym przypadku nie uległy pełnemu wyrównaniu, chociaż po 84 dniach zawartość BPB w komorze pomiarowej wynosiła $49,02 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/l}$. Zaobserwowano również zmianę szybkości dyfuzji barwnika w czasie. W początkowym okresie zachodziła ona szybciej, o czym świadczył duży spadek współczynnika retencji z 0,94 po 1 dniu do 0,44 po 14 dniach (stężenie

w komorze pomiarowej wyniosło $35,74 \pm 1,13 \mu\text{mol/l}$). Po tym czasie, w badanym układzie rejestrowano liniowy i wolniejszy przyrost stężenia BPB.

Modyfikacja włókniny za pomocą ChronoSilu przyniosła oczekiwany rezultat. Zaobserwowano niemal całkowite zatrzymanie transportu barwnika przez membranę w czasie 84 dni. Stężenie BPB w komorze pomiarowej miało wartość poniżej $1 \mu\text{mol/l}$ przez 28 dni, a ostatecznie wyniosło $6,11 \pm 0,71 \mu\text{mol/l}$. Współczynnik retencji ulegał niewielkim zmianom, dlatego możliwe było wyciągnięcie jego średniej wartości dla całego eksperymentu ($0,98 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$). Uzyskany rezultat wynikał z hydrofobowych właściwości ChronoSilu, czego skutkiem była również niska chłonność i zwilżalność włókniny.

Badania wykazały możliwość wpływu na szybkość transportu modelowego barwnika, przez strukturę włókniny. Dowiedziono, że uzyskanie kontroli nad kierunkowością uwalniania leków z włóknin PCLTMC:PCL zmodyfikowanych za pomocą nanowłókien PCU jest możliwe. W przypadku PCLTMC:PCL/Flex/5/D uzyskano ograniczenie przenikania BPB przez wewnętrzną strukturę materiału, a także silne zahamowanie procesów transportu, zaobserwowane we włókninie PCLTMC:PCL/Sil/5/D. Niemniej jednak, ze względu na bardziej zwartą strukturę frakcji PCLTMC:PCL oraz jej większą hydrofobowość spodziewano się uzyskać znacznie większą stabilizację wartości współczynnika retencji materiałów badanych w omówionym eksperymencie, niż dla włóknin zawierających PDLGA. Różnice były jednak niewielkie i ograniczały się głównie do spowalniania przenikania BPB w początkowym okresie obserwacji (Tabela 41 i Tabela 49). Ze względu na skurcz i spęcznienie włókien PDLGA, znajdującego się w stanie szklistym w temperaturze inkubacji, włókniny zmodyfikowane PCU wykazywały wyższe współczynniki retencji w końcowej fazie eksperymentu. Można więc stwierdzić że gęstość matrycy związana ze stanem w jakim znajduje się w temperaturze inkubacji (szklistym lub lepkosprężystym) miała duże znaczenie, co również zaobserwowano podczas eksperymentu związanego z badaniem szybkości uwalniania leków (Rozdział 16.1.7).



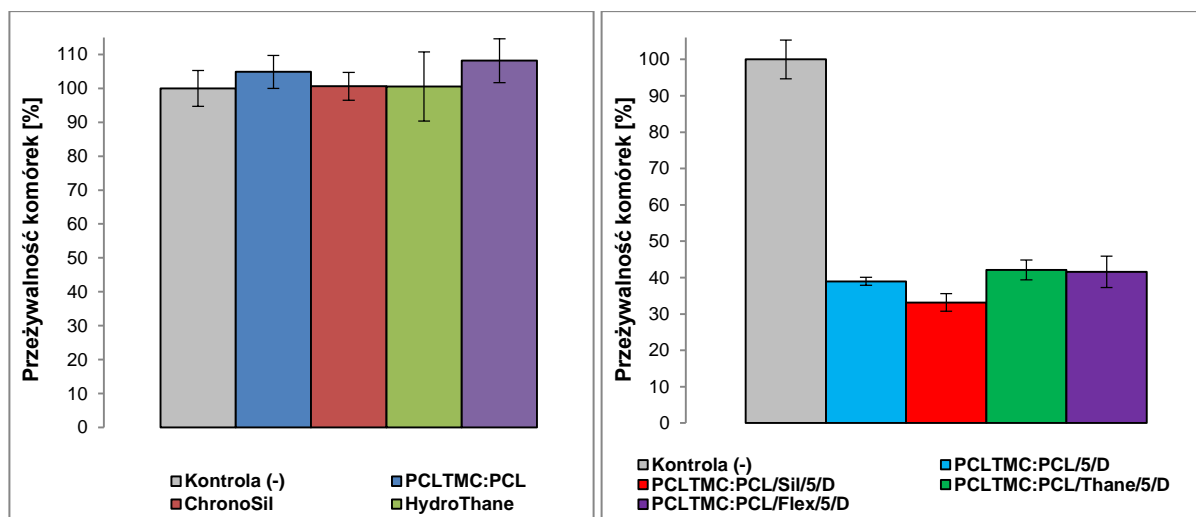
Rys. 82. Przykładowe zdjęcie włóknin, wykonane po 42 dniach inkubacji w kontakcie z roztworem barwnika BPB

16.1.10. Badania włóknin PCLTMC:PCL/PCU z wykorzystaniem linii komórkowej fibroblastów

Eksperymenty z wykorzystaniem linii fibroblastów przeprowadzono w celu oceny wpływu sirolimusu oraz soli sodowej diklofenaku na cytotoksyczność *in vivo* oraz adhezję komórek na powierzchni włóknin otrzymanych metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia, w których mikrowłókna nośnika w formie mieszaniny PCLTMC:PCL zostały wytworzone z roztworów w DCM.

16.1.10.1. Cytotoksyczność *in vitro*

Ocenę cytotoksyczności przeprowadzono na włókninach PDLGA, ChronoSil, HydroThane oraz ChronoFlex, wytworzonych metodą klasycznego elektroprzędzenia, a także na elektroprzędzonych dwustrumieniowo materiałach składających się z przeplotu mieszanki PCLTMC:PCL zawierającej leki oraz nanowłóknien modyfikatora PCU. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 83.



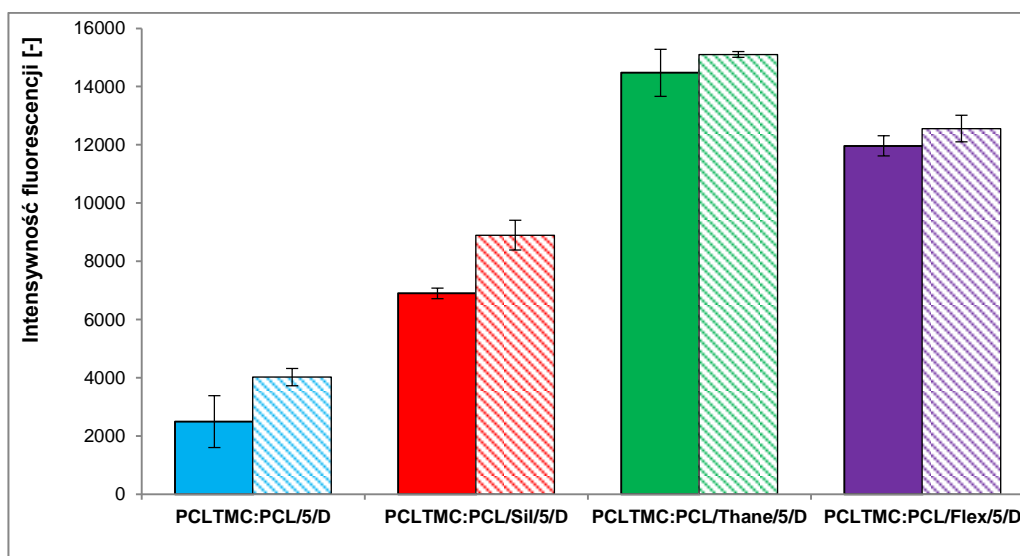
Rys. 83. Przeżywalność komórek wyznaczona w materiałach wyjściowych (z lewej) oraz we włókninach zawierających po 5% wag. SLM oraz DiNa (z prawej) ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Przeżywalność komórek w obecności mieszaniny PCLTMC:PCL była porównywalna z wynikami uzyskanymi dla PDLGA. Jednak, po wprowadzeniu leków, cytotoksyczność wszystkich włóknin znacznie wzrosła w stosunku do wyników uzyskanych w *Eksperymencie 1* oraz *Eksperymencie 2*. Prawdopodobną przyczyną był wzrost szybkości uwalniania sirolimusu (Rys. 78). Wyjątek stanowiła włóknina PCLTMC:PCL/Flex/5/D, która wykazywała wolniejsze uwalnianie SLM z PCLTMC:PCL niż z matrycy PDLGA, jednak mimo to, wykazywała mniejszą przeżywalność komórek niż w przypadku PDLGA/Flex/5/D. Zaobserwowano, że cytotoksyczność nie była proporcjonalna do różnic w szybkości uwalniania sirolimusu pomiędzy poszczególnymi materiałami. Przykładowo, włóknina zawierająca nanowłókna ChronoSil, pomimo uwolnienia stosunkowo małej dawki leku (ponad 2 razy mniejszej niż w przypadku modyfikacji za pomocą nanowłóknien HydroThane, oraz ponad 4 razy mniejszej niż włóknina niezmodyfikowana) wykazywała najniższą przeżywalność komórek, na poziomie $33 \pm 3\%$. Ustalenie przyczyn uzyskania takich rezultatów jest przedmiotem dalszych badań, ponieważ takie

same tendencje pojawiły się zarówno w *Eksperymencie 1* jak i 2. Zatem, ponownie nie zaobserwowano efektu dawki leku.

16.1.10.2. Adhezja fibroblastów

Zbadano wpływ zwiększenia hydrofobowości włókien i szybkości uwalniania leków oraz zmniejszenia powierzchni właściwej materiału na adhezję fibroblastów. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 84.



Rys. 84. Adhezja fibroblastów na powierzchni włókien zawierających sirolimus (pola pełne) oraz sól sodową diklofenaku (pola kreskowane) ($\bar{x} \pm SD$; N=3)

Od strony materiału uwalniającej rapamycynę, ze względu na jej bezpośredni kontakt z powierzchnią odbieralnika włókien podczas elektroprzędzenia, zaobserwowano zmniejszenie powierzchni właściwej. W połączeniu z przyspieszeniem uwalniania SLM oraz większą niż dla PDLGA hydrofobowością matrycy, stworzyło to najbardziej niekorzystne warunki dla adhezji fibroblastów. Z tego względu, zmierzone wartości intensywności fluorescencji (IF) były niższe dla nośnika leku PCLTMC:PCL niż dla PDLGA. Dla włókny odniesienia było to 2487 ± 890 , co było najniższym z uzyskanych wyników. Po wprowadzeniu modyfikatorów PCU zmiany w stosunku do włókien zawierających PDLGA również były również widoczne. Włókny, w których wykorzystano bardziej hydrofilowe nanowłókna HydroThane oraz ChronoFlex pozwalały na adhezję większej liczby fibroblastów. Różnice pomiędzy stronami zawierającymi SLM oraz DiNa były niewielkie ze względu na podobną morfologię powierzchni. Słabsza adhezja do strony włókny zawierającej rapamycynę wynikała najprawdopodobniej z jej antyproliferacyjnych właściwości.

Podsumowując, stosując bardziej hydrofobową matrycę oraz w dużym stopniu ograniczając rozwinięcie powierzchni właściwej włókny, uzyskano zmniejszenie zdolności adhezji komórek do otrzymanego materiału.

17. Podsumowanie

Kontrolę szybkości uwalniania leku z polimerowej matrycy uzyskuje się zazwyczaj poprzez zmianę jej parametrów, takich jak struktura chemiczna, masa molowa, stopień krystaliczności czy też rozwinięcie powierzchni właściwej systemu uwalniania. Stosowane są także systemy wielofazowe, składające się z dwóch lub większej liczby komponentów. Do typowych sposobów ich otrzymywania zalicza się wytwarzanie mieszanin, kompozytów, laminatów (struktur warstwowych) oraz innych układów, powstałych np. w wyniku wykorzystania emulsji. W dalszej części tego rozdziału przedstawiono podsumowanie uzyskanych wyników na tle różnych metod zmiany szybkości uwalniania leku z polimerowej matrycy.

Systemy kontrolowanego uwalniania leków bazujące na regulacji profilu uwalniania poprzez zmianę struktury chemicznej lub wykorzystanie różnicy we właściwościach fizycznych polimerów, takich jak stopień krystaliczności lub hydrofilowość, znane są m.in. z publikacji Frank *et al.*, w której zaobserwowano, że lidokaina uwalniała się szybciej z kopoliestru PLGA o stosunku molowym jednostek laktydylowych do glikolidylowych wynoszącym 80:20, niż z homopolimeru PLA o tej samej masie molowej. Wprowadzając do struktury PLA jednostki glikolidylowe, uzyskano zarówno zmniejszenie stopnia krystaliczności jak i wzrost hydrofilowości polimeru, co spowodowało przyspieszenie uwalniania leku [267]. Systemy w postaci mieszanin polimerowych, bazujące na dostosowywaniu szybkości uwalniania leku poprzez zmieszanie nośników o różnych właściwościach, w celu otrzymania nowego typu matrycy, najczęściej o pośredniej charakterystyce w stosunku do materiałów wyjściowych, opisano w pracy Wang i Windbergsa [268]. Ze wzrostem zawartości poli(glikolu etylenowego) (PEG) w mieszaninie z kopoliestrem poli(laktydy-co-glikolid) (PLGA), uzyskano zmianę profilu uwalniania acyklowiru. W badaniach wykorzystano różnice w parametrach obu polimerów takich jak rozpuszczalność w wodzie oraz masa molowa. Zaobserwowano, że ze względu na rozpuszczanie PEG, podczas inkubacji nastąpiło rozwinięcie powierzchni właściwej elektroprzędzonych włókien. Szybkość uwalniania leku rosła wraz ze wzrostem zawartości PEG do momentu, gdy jego ilość w mieszaninie zaczynała zaburzać strukturę włókniny, co wynikało ze słabej mieszalności termodynamicznej obu komponentów i zmniejszenia stabilności strumienia elektroprzędzonego roztworu. W konsekwencji wytworzona została folia, co przyczyniało się do zmniejszenia aktywnej powierzchni, z której uwalniana była substancja lecznicza. Spowodowało to zmniejszenie szybkości procesu. W publikacji Chou i Woodrowa składniki mieszaniny – poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) oraz poli(D,L-laktyd-co-glikolid) (PDLGA) różniły się zarówno hydrofilowością jak i stopniem krystaliczności. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem zawartości amorficznego PDLGA, zmniejszał się wyrzut początkowy oraz szybkość uwalniania hydrofilowego tenofowiru. Efekt osiągnięto wprowadzając do układu polimer, o dużym powinowactwie do substancji aktywnej [269]. Innym rodzajem struktury systemu kontrolowanego uwalniania leku jest kompozyt, czyli układ co najmniej dwufazowy, gdzie jeden materiał stanowi osnowę dla drugiego. Występuje w nim wyraźna granica faz, przy czym faza rozproszona jest nieciągła. Przykładowo, w patencie US2011275520 A1 przedstawiono kompozytowy system kontrolowanego uwalniania pestycydów w formie włókniny, w którym biodegradowalną polimerową osnowę z polilaktydu (PLA) napełniono nanokryształami

celulozowymi, przyspieszającymi jej degradację, co spowodowało wzrost szybkości uwalniania [270]. Opracowano również bardziej skomplikowane systemy uwalniania, opisane m.in. w patencie US2012058100 A1. Wynalazek ten ujawnia, że zmianę szybkości uwalniania z dwóch materiałów polimerowych różniących się właściwościami fizycznymi, gdzie lek uwalnia się szybciej z jednego materiału i wolniej z drugiego materiału, można osiągnąć, poprzez przeprowadzenie elektroprządzenia z wykorzystaniem zjawiska emulsyfikacji obu układów lek-polimer. Doprowadziło to do spowolnienia uwalniania leku, który uwalniał się szybciej z jednego materiału i przyspieszenia uwalniania leku, który uwalniał się wolniej z drugiego materiału. Wynalazek dotyczył samego sposobu prowadzenia elektroprządzenia, pozwalającego na przetwarzanie roztworów polimerowych o niższych stężeniach niż w sposób konwencjonalny [271]. Opracowano również systemy kontrolowanego uwalniania w postaci warstwowej. Przykład stanowiła praca Kamath *et al.*, w której metodą elektroprządzenia warstwa po warstwie wytworzono strukturę typu „kanapka” (*ang. sandwich-type structure*). Szybkość uwalniania ibuprofenu z poli(ϵ -kapolaktanu) zależała w tym przypadku od grubości izolujących warstw zewnętrznych, oraz od stężenia roztworu polimeru wykorzystanego do ich wytworzenia [272].

Badania mające na celu uzyskanie kontroli nad uwalnianiem leków z polimerowych matryc, prowadzone są w celu zwiększenia skuteczności leczenia, a także umożliwienia realizacji terapii indywidualnych, dostosowanych do danego przypadku klinicznego. Jak wcześniej wspomniano, najprostszym sposobem dopasowania szybkości uwalniania leku do potrzeb, jest zmiana parametrów jego nośnika, co w perspektywie komercyjnych zastosowań, wiąże się z wysokimi kosztami syntezy lub zakupu innego typu polimeru. W takim przypadku istnieje również możliwość, że zmiana materiału matrycy może niekorzystnie wpływać na jej interakcję z lekiem, co wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań. Z kolei w przypadku układów wielofazowych np. laminatów i kompozytów, często obserwuje się defekty struktury wynikające z rozwarstwienia i separacji fazowej. Powodują one pogorszenie właściwości mechanicznych polimerowego nośnika leku w trakcie jego degradacji. Mogą również doprowadzić do niekontrolowanego uwolnienia zbyt dużej dawki substancji terapeutycznej. Wykorzystywanie emulsji lub suspensji również jest utrudnione, ponieważ są one niestabilne podczas ich przetwarzania. Zawiesiny mają tendencję do sedymentacji, co powoduje, że w celu uzyskania izotropowych właściwości systemu uwalniania, układ suspensyjny wymaga stabilizacji i intensywnego mieszania. Dodatkowo, czasem wymagane jest stosowanie kosztownych nanonapełniaczy np. w czasie elektroprządzenia zawiesin, aby nie zrywać wytwarzanych nanowłókien. W przypadku wykorzystywania emulsji sytuacja wygląda podobnie. Dwufazowe układy tego typu również wymagają stabilizacji, która np. w warunkach mikroprzepływowych, pojawiających się podczas elektroprządzenia, jest dodatkowym utrudnieniem. Poza tym, istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia separacji fazowej, zaburzającej równomierne uwalnianie dawek leku. Zjawisko to występuje również w przypadku braku mieszalności termodynamicznej pomiędzy komponentami podczas tworzenia mieszanin. Prowadzi to do osłabienia właściwości mechanicznych materiału, ze względu na powstawanie wolnych przestrzeni na granicy faz np. na skutek skurczu jednego z komponentów, będącego konsekwencją silniejszej krystalizacji oraz jako wynik migracji komponentu będącego w mniejszej ilości, najczęściej w kierunku powierzchni. Dlatego proces tworzenia mieszanin w większości przypadków wymaga wprowadzenia kompatybilizatorów zwiększających mieszalność

materiału, co niestety podnosi koszty wytwarzania i może wpływać na uwalnianie leku za pośrednictwem oddziaływań międzycząsteczkowych.

Włókniny otrzymane metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia charakteryzujące się przeplotem dwóch frakcji włókien, są wolne od wielu wad porównywalnych materiałów wytworzonych w procesach tj. wylewanie z roztworów czy też elektroprzędzenie mieszanin, emulsji lub suspensji. W obrębie matrycy nie występuje separacja fazowa, powodująca zmniejszenie kontroli nad uwalnianiem oraz obniżająca właściwości mechaniczne włókniny. Nie jest wymagane również stosowanie żadnego rodzaju stabilizatorów lub kompatybilizatorów. Ze względu na możliwość prowadzenia procesu zarówno ze stałą jak i zmienną szybkością dozowania, ryzyko rozwarstwienia materiału jest znacznie mniejsze niż w przypadku klasycznych struktur warstwowych lub laminatów.

Jak opisano w *Rozdziale 2*, biodegradowalne siatki chirurgiczne, pomimo lepszej biogodności, wykazują niewystarczające właściwości mechaniczne, co jest głównym czynnikiem ograniczającym ich szerokie zastosowanie. Z drugiej strony, implanty nieulegające biodegradacji, zdecydowanie bardziej uniwersalne i niezawodne, zwykle wywołują silniejszą reakcję organizmu człowieka na ciało obce, związaną z powstawaniem stanów zapalnych i bólem. W przeprowadzonych badaniach, wykorzystując metodę dwustrumieniowego elektroprzędzenia podjęto próbę synergistycznego połączenia zalet obu typów polimerowych biomateriałów, przy jednoczesnej eliminacji ich wad, z punktu widzenia potencjalnego zastosowania wytworzonych włókien w leczeniu przepuklin. Wprowadzenie modyfikatorów PCU spowodowało wzrost stabilności właściwości mechanicznych otrzymanych materiałów, nie tylko dzięki wprowadzeniu nieodegradowalnej frakcji modyfikatora PCU, lecz również ze względu na obserwowane spowolnienie procesu degradacji hydrolytycznej.

Porównanie wytrzymałości mechanicznej otrzymanych włókien z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy jest dość problematyczne, ponieważ kluczowe parametry wynikające ze statycznej próby rozciągania zależą od kształtu próbki, wymiarów odcinka pomiarowego, prędkości odkształcania oraz temperatury pomiaru. Niestety, metodyka charakterystyki właściwości mechanicznych materiałów tego typu nie jest dobrze usystematyzowana w badaniach naukowych. Zazwyczaj uzyskane dane można porównać tylko w ramach jednej procedury pomiarowej. Niemniej jednak, odwołując się do rezultatów uzyskanych w innych pracach, warto zwrócić uwagę na publikacje Chakroffa *et al.* [22] oraz See *et al.* [16]. W pierwszej z nich przeprowadzono próbę rozciągania 8 rodzajów włókien otrzymanych metodą elektroprzędzenia: sześciu biodegradowalnych i dwóch niebiodegradowalnych. Druga publikacja to artykuł przeglądowy porównujący właściwości dużej liczby implantów w formie siatek chirurgicznych dostępnych na rynku. Na podstawie zebranych danych, nawet pomimo różnic w procedurze określania właściwości mechanicznych, można stwierdzić, że komercyjne implanty wykazują znacznie wyższą wytrzymałość mechaniczną przy mniejszej gęstości objętościowej niż włókniny wytwarzane metodą elektroprzędzenia. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy nie odbiegają jednak zbyt od charakterystyki elektroprzędzonych włókien uzyskanych w innych badaniach, chociaż wartości wytrzymałości na rozciąganie były nieco niższe od prezentowanych w literaturze. Głównym powodem było przeprowadzenie pomiarów w temperaturze ciała ludzkiego, po uprzednim kondycjonowaniu materiału w 37 °C. Zdecydowana większość publikacji podaje parametry wytrzymałościowe mierzone w temperaturze pokojowej, co pozwala na bezpośrednie porównanie

materiałów, ale często nie dostarcza informacji, czy mogłyby spełnić swoją funkcję w praktyce. Jest to szczególnie ważne w przypadku biodegradowalnych poliestrów, ponieważ przejście szkliste tej klasy polimerów często rozpoczyna się w temperaturach zbliżonych do temperatury ludzkiego ciała, a w niektórych przypadkach niższych. Materiały tego typu, gdy znajdują się na granicy stanu szklistego i lepkosprężystego, charakteryzują się tym, że ich właściwości mechaniczne zaczynają spadać i zależą głównie od obecności fazy krystalicznej i oddziaływań międzycząsteczkowych. W rezultacie, polimery amorficzne oraz o niewielkiej zawartości fazy krystalicznej tracą swoją wytrzymałość mechaniczną w znacznym stopniu.

W niniejszej pracy kontrola nad szybkością uwalniania leków została uzyskana, bez zamiany właściwości fizycznych oraz chemicznych matrycy. Cel został osiągnięty poprzez zastosowanie przeplotu mikrowłókien nośnika leku z modyfikatorami w postaci nanowłókien poli(węglano uretanowych), różniących się hydrofilowością oraz higroskopijnością. Ich obecność zmieniła właściwości systemu uwalniania, wpływając na jego powinowactwo do otaczającego środowiska oraz na procesy dyfuzyjne, dotyczące transportu wody, produktów degradacji oraz substancji aktywnych. Początkowe właściwości nośnika w poszczególnych eksperymentach nie ulegały zmianie, ponieważ wytworzono dwie wzajemnie oplatające się frakcje włókien, stanowiące odrębne, lecz oddziaływające na siebie sieci wymieszane ze sobą na poziomie mikro- i nanostrukturalnym. Przeprowadzone badania potwierdziły, że przedstawiony sposób kontrolowania profilu uwalniania można zastosować do włókien PDLGA o dużym stosunku powierzchni do objętości, składających się z włókien gładkich (*Eksperyment 1*) oraz silnie porowatych (*Eksperyment 2*), a także do bardziej hydrofobowych materiałów o słabym rozwinięciu powierzchni właściwej, w których rolę matrycy pełniła mieszanina PCLTMC:PCL (*Eksperyment 3*). Wykorzystanie dwóch różnych typów nośnika, a także leków o skrajnych wartościach rozpuszczalności w wodzie obrazuje pewien stopień uniwersalności metody. Niemniej jednak, większą kontrolę nad uwalnianiem zaobserwowano w przypadku hydrofobowego sirolimusu, niż łatwo rozpuszczalnej soli sodowej diklofenaku. Uzyskane wyniki udowadniają, że istnieje możliwość dostosowania szybkości uwalniania danej substancji aktywnej do potrzeb, mając do dyspozycji jeden, dobrze poznany, materiał matrycy oraz jeden lub kilka modyfikatorów, którymi, jak w przypadku przeprowadzonych badań, były relatywnie tanie, komercyjnie dostępne poli(węglano uretany). Potencjalnie daje to możliwość obniżenia kosztów otrzymywania spersonalizowanych systemów kontrolowanego uwalniania leków, a także implantów medycznych. Nic nie stoi na przeszkodzie, wykorzystania zarówno materiałów biodegradowalnych, jak i nieulegających biodegradacji, w zależności od potrzeb. Wprowadzenie do rdzenia opracowanych włókien litej membrany wytworzonej metodą elektrorozpylenia wykazało potencjalną możliwość kierunkowego uwalniania leków, zwłaszcza w przypadku zastosowania najbardziej hydrofobowego modyfikatora (ChronoSilu). Stwarza to korzystne warunki uwalniania substancji o działaniu cytotoksycznym, co mogłoby rozszerzyć zakres aplikacyjności otrzymanych materiałów np. o terapię przeciwnowotworowe, przy założeniu wykorzystania biodegradowalnego modyfikatora, takiego jak np. poli(ϵ -kapolakton) lub jego kopolimery. Zaobserwowano również, że zarówno obecność leków danego typu, rozwinięcie powierzchni właściwej poszczególnych stron włókniyny oraz jej hydrofilowość wpływały na zdolność do adhezji komórek na jej powierzchni. Z jednej strony może to korzystnie

oddziaływać na procesy regeneracyjne uszkodzonych tkanek, ponieważ strona wykazująca dobrą adhezję może działać jak rusztowanie komórkowe, z drugiej zaś, ograniczenie zdolności adhezji komórek do powierzchni może zmniejszyć prawdopodobieństwo tworzenia się niepożądanych zrostów, które stanowią problem w przypadku leczenia przepuklin za pomocą siatek chirurgicznych. Przeprowadzone badania dotyczące wyznaczenia współczynnika retencji włóknin oraz adhezji fibroblastów stanowiły jednak tylko pewne oszacowanie potencjalnych właściwości opracowanego materiału, przeprowadzone w warunkach *in vitro*. Aby uzyskać pełne dane dotyczące aplikacyjności opisanych włóknin, konieczna jest ewaluacja w warunkach *in vivo*, co stanowi cel dalszych prac nad zaprezentowanym zagadnieniem.

18. Wnioski

Celem pracy było zbadanie, czy możliwa jest kontrola szybkości uwalniania leku z biodegradowalnej poliestrowej matrycy w postaci włókniny, bez zmiany jej właściwości chemicznych i fizycznych oraz stabilizacja wytrzymałości mechanicznej w czasie degradacji hydrolitycznej. Zmianę szybkości uwalniania osiągnięto bez modyfikacji właściwości fizycznych i chemicznych matrycy. Aby zbadać uniwersalność opisanej metody, w roli nośnika leków wykorzystano dwa biodegradowalne materiały polimerowe różniące się hydrofilowością. Pierwszym z nich był poli(D,L-laktyd-co-glikolid) (PDLGA) a drugim mieszanina kopolimeru poli(ϵ -kaprolakton-co-węglan trimetyleny) z homopolimerem poli(ϵ -kaprolaktonem) (PCLTMC:PCL). Funkcję modyfikatora szybkości degradacji hydrolitycznej i uwalniania leków, a także stabilizatora właściwości mechanicznych pełniły nieulegające biodegradacji nanowłókna otrzymane z trzech handlowo dostępnych poli(węglano uretanów) różniących się hydrofilowością, higroskopijnością oraz właściwościami termicznymi i mechanicznymi. Korzystając z zalet biodegradowalnych i niebiodegradowalnych biomateriałów polimerowych, opracowano strukturę nanomateriału w formie włókniny o podwyższonej stabilności właściwości mechanicznej, łączącego funkcjonalność zarówno systemu kontrolowanego uwalniania leków oraz implantu medycznego w formie siatki lub łaty chirurgicznej, o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu przepuklin.

Na podstawie wyników, uzyskanych w ramach przeprowadzonych badań podstawowych, możliwe było sformułowanie następujących wniosków oraz prawidłowości:

- Głównym czynnikiem decydującym o szybkości uwalniania substancji aktywnych z matrycy w formie elektroprzędzonych włókien były procesy dyfuzyjne, których wpływ był tym większy, im łatwiej dany lek rozpuszczał się w wodzie, co potwierdziło dopasowanie modeli kinetyki uwalniania leków do poszczególnych profili uwalniania.
- Szybkość uwalniania leków z polimerowej, biodegradowalnej matrycy w formie włókniny otrzymanej metodą elektroprzędzenia można kontrolować wprowadzając przeplot z nanowłóknami innego polimeru, różniącego się hydrofilowością i higroskopijnością od materiału nośnika substancji aktywnej. Dzięki temu, możliwa była zmiana powinowactwa powierzchni materiału do otaczającego środowiska, co wpłynęło na szybkość procesów transportu wody, leków oraz produktów hydrolizy kopoliestrów, w rezultacie wpływając również na przebieg procesów degradacji hydrolitycznej oraz erozji.
- Wpływ wprowadzenia modyfikatorów w postaci nanowłókien poliuretanowych, na szybkość uwalniania soli sodowej diklofenaku sprowadzał się głównie do kontroli ilości wchłoniętej wody, która umożliwiała rozpuszczanie leku w początkowym etapie inkubacji. Efekt został uzyskany poprzez zmianę powinowactwa otrzymanego materiału do medium degradacyjnego oraz za sprawą wydłużenia drogi dyfuzji leku.
- W przypadku substancji trudno rozpuszczalnych, jak sirolimus, wpływ na kinetykę uwalniania, oprócz procesów dyfuzyjnych, miała szybkość rozpuszczania leku. Im dłużej trwało uwalnianie, tym większy udział miały również procesy degradacji oraz erozji matrycy.

- Wprowadzenie modyfikatora w postaci hydrofobowych nanowłókien, które w niniejszej pracy wytworzono z poliuretanu ChronoSil AL80A5% spowodowało zmniejszenie szybkości uwalniania leków, niezależnie od ich rozpuszczalności w wodzie oraz od hydrofilowości i rozwinięcia powierzchni właściwej mikrowłókien matrycy. Ten wariant modyfikacji sprzyjał uzyskaniu uwalniania najbardziej równomiernych i jednocześnie najmniejszych dawek leków, w szczególności sirolimusu. ChronoSil ograniczał wnikanie wody do przestrzeni pomiędzy włóknami, co utrudniało zajście procesów dyfuzyjnych oraz hydrolizy, jednocześnie sprzyjał degradacji w masie.
- Wprowadzenie modyfikatora w postaci higroskopijnych nanowłókien HydroThane AR25 80A, o większej hydrofilowości niż ChronoSil, spowodowało wzrost ilości zaabsorbowanej wody przez materiał, w wyniku czego uzyskano stabilizację procesu wymiany masy w obrębie włókniny. Skutkiem było promowanie erozji powierzchniowej biodegradowalnej frakcji polimeru wraz ze wzrostem stosunku powierzchni do objętości włókniny. HydroThane spowodował spowolnienie degradacji bardziej hydrofilowej matrycy PDLGA otrzymanej z roztworów w HFIP, ponieważ ze względu na wzrost chłonności wody powstające na froncie erozji kwaśne oligomery mogły być od razu neutralizowane przez bufor znajdujący się w medium. W przypadku bardziej zwartej matrycy PDLGA otrzymanej z roztworów w DCM, której mikrowłókna były większych rozmiarów oraz hydrofobowej matrycy PCLTMC:PCL, uzyskano przyspieszenie degradacji ze względu na promowanie transportu wody do wnętrza włókniny.
- Zastosowanie najbardziej hydrofilowego modyfikatora w postaci nanowłókien ChronoFlex AL75D w niejednoznaczny sposób wpłynęło na szybkość degradacji biodegradowalnej matrycy zarówno PDLGA jak i PCLTMC:PCL. W pierwszym przypadku proces przyspieszał w czasie trwania inkubacji, w drugim zaś zwalniał. Wpływ na szybkość uwalniania leków również wykazywał różne tendencje w zależności od rodzaju matrycy oraz rozpuszczalności substancji aktywnej w wodzie. W przypadku hydrofobowego sirolimusu nieznacznie przyspieszał jego uwalnianie z matrycy PDLGA, lecz jednocześnie najbardziej spowalniał uwalnianie z matrycy PCLTMC:PCL. Tendencja, jaką zaobserwowano dla soli sodowej diklofenaku była odwrotna. Takie obserwacje mogą świadczyć, że nie tylko hydrofilowość modyfikatora wpływała na kinetykę uwalniania leków, lecz również pewną rolę pełniła struktura przepłotu włókien oraz właściwości chemiczne i fizyczne polimeru. Czynniki te mogły wpływać zarówno na wydłużenie drogi dyfuzji, jak i na interakcje nanowłókien z lekami oraz matrycą, dla której stanowiły one fizyczny opłot, o gęstości wzrastającej w kierunku rdzenia włókniny.
- Wprowadzenie modyfikatorów w formie nanowłókien poliuretanowych, pozwoliło na poprawę stabilności właściwości mechanicznych włókien w czasie degradacji hydrolitycznej, względem biodegradowalnych materiałów niezmodyfikowanych. Wytrzymałość na rozciąganie włókien po degradacji zależała od średnic nanowłókien PCU, ich zdolności do wchłaniania wody oraz temperatury zeszklenia zastosowanego poli(węglano uretanu).
- Obecność leków wpłynęła na zmiany właściwości mechanicznych włókien w czasie degradacji hydrolitycznej frakcji biodegradowalnej. Sól sodowa diklofenaku uwalniając się generowała nanopory przyspieszające erozję matrycy, co zmniejszało wytrzymałość materiału. Sirolimus hydrofobizując nośnik, spowalniał jego degradację, co stabilizowało właściwości mechaniczne.

Efekt był silniejszy wraz ze wzrostem początkowej zawartości leków oraz dla matrycy o temperaturze zeszklenia wyższej niż temperatura inkubacji.

- Zastosowanie wewnętrznej litej membrany pozwoliło na ograniczenie przenikania przez włókninę substancji małowcząsteczkowej reprezentującej sirolimus (błękitu bromofenolowego), a także na uzyskanie pewnej kontroli nad tym procesem. Im większa hydrofobowość i/lub temperatura zeszklenia PCU tym obserwowano wolniejszy spadek współczynnika retencji.
- Cytotoksyczność *in vitro* włókniń, wzrastała wraz ze wzrostem szybkości uwalniania sirolimusu. Zaobserwowano jednak tylko wpływ SLM na przeżywalność komórek, nie zaobserwowano efektu uwolnionej dawki.
- Modyfikując morfologię powierzchni włókniń, ich hydrofilowość oraz wprowadzając sirolimus o właściwościach antyproliferacyjnych uzyskano zmniejszenie adhezji fibroblastów na powierzchni włókniny zawierającej SLM, względem powierzchni zawierającej DiNa. Wszystkie wymienione efekty nakładały się na siebie, zaobserwowano jednak, że dla bardziej hydrofilowych włókniń zawierających PDLGA adhezja komórek była większa niż w przypadku materiałów zawierających PCLTMC:PCL.

Otrzymane metodą dwustrumieniowego elektroprzędzenia włókniny, badano w warunkach *in vitro* pod kątem potencjalnego zastosowania w leczeniu przepuklin. Uzyskane podczas realizacji badań podstawowych wyniki, umożliwiły wyciągnięcie szeregu wniosków dotyczących aplikacyjnych aspektów niniejszej pracy:

- W roli matrycy uwalniającej leki najkorzystniejsze jest stosowanie polimerów amorficznych o temperaturze zeszklenia znajdującej się w okolicy temperatury ludzkiego ciała lub niższej, ponieważ taki zabieg eliminuje skurcz wynikający z krystalizacji oraz pozwala na łatwe dopasowanie się włókniny do krzywizn wynikających z anatomii struktur biologicznych (stabilność wymiarów i sztywności materiału w początkowym okresie po potencjalnej implantacji). Zbyt niska wartość T_g powoduje zlewanie się włókien w jednolitą masę, co zwiększa właściwości antyadhezyjne, ale jednocześnie, potencjalnie może ograniczyć zdolność do regeneracji tkanek.
- Właściwości mechaniczne materiału najkorzystniej dostosowywać do potrzeb dobierając odpowiedni poliuretan, zakładając, że biodegradowalny nośnik leku, o ile początkowo będzie wykazywał znaczącą wytrzymałość, stosunkowo szybko ją utraci na skutek degradacji. Ze względu na bardzo dużą różnorodność poliuretanów, wynikającą ze sposobu ich syntezy, możliwe jest uzyskanie polimeru o odpowiednich właściwościach fizycznych, chemicznych oraz mechanicznych, co umożliwia regulację zarówno degradacji nośnika leków, szybkości ich uwalniania, jak również stabilizowanie wytrzymałości mechanicznych całej włókniny.
- W roli modyfikatora właściwości mechanicznych najkorzystniejszym rozwiązaniem jest wykorzystanie poli(węglano uretanu) należącego do grupy elastomerów termoplastycznych o temperaturze zeszklenia nieco wyższej niż temperatura ciała ludzkiego, takiego jak np. zastosowany w badaniach ChronoFlex AL75D. Ze względu na występowanie w stanie szklistym będzie on wykazywał wysoką wytrzymałość, w szczególności w odcinku odkształceń sprężystych,

przy jednoczesnej elastyczności w zakresie wystarczającym dla pełnienia funkcji wzmacniającej tkanki miękkie.

- W roli membrany, stanowiącej barierę dla dyfuzji leków przez wewnętrzną strukturę włókniny, najkorzystniej wykorzystać polimery o właściwościach hydrofobowych, takie jak zastosowany w badaniach ChronoSil Al80A5%. Jeżeli zaszłaby taka potrzeba, możliwe jest użycie polimeru, który w kontrolowany sposób może przepuszczać lek, jak np. wykorzystany ChronoFlex. Potencjalnie możliwe jest zastosowanie membrany biodegradowalnej, o czasie degradacji dłuższym niż czas uwalniania leku, co może zwiększyć pulę zastosowań tego typu systemów uwalniania substancji aktywnych.
- Sirolimus, ze względu na cytotoksyczne działanie powinien uwalniać się w minimalnym stopniu, pozwalającym na uzyskanie właściwości antyproliferacyjnych na powierzchni włókniny.
- Ze względu na obniżanie adhezji fibroblastów, stronę materiału zawierającą sirolimus, która po potencjalnej implantacji byłaby skierowana do otrzewnej, najkorzystniej byłoby wykonać z hydrofobowego, amorficznego polimeru, takiego jak np. wykorzystany w badaniach PCLTMC:PCL. Potencjalnie zmniejszyłoby to prawdopodobieństwo przyrośnięcia implantu do otrzewnej lub narządów wewnętrznych.
- Ze względu na lepszą adhezję komórek, stronę materiału zawierającą sól sodową diklofenaku, która po potencjalnej implantacji byłaby skierowana do uszkodzonej mechanicznie tkanki, najkorzystniej byłoby wykonać z polimeru, który w początkowym okresie po implantacji utrzyma trójwymiarową strukturę włókniny, dzięki czemu materiał powinien zadziałać jak rusztowanie komórkowe i przyspieszyć regenerację tkanek. Taki efekt można uzyskać wykorzystując przepłot włókien biodegradowalnego, polimeru o optymalnej hydrofilowości i temperaturze zeszklenia w okolicy temperatury ciała ludzkiego z higroskopijnym modyfikatorem PCU, który zapobiegłby zapadnięciu się struktury przy jednoczesnym zwiększeniu chłonności wody przez materiał, co ułatwiłoby przemieszczanie się komórek w głąb struktury. Przykład takiej kombinacji materiałów stanowią wykorzystane w badaniach mikrowłókna PDLGA otrzymane z roztworów w HFIP, oplecione nanowłóknami poliuretanu HydroThane AR25 80A.

Podsumowując, założeniem działania opracowanego materiału pod kątem potencjalnego zastosowania w leczeniu przepuklin, jest uwalnianie w kontrolowany sposób leków do konkretnych tkanek, przy jednoczesnym zapewnieniu mechanicznego wzmocnienia uszkodzonych struktur biologicznych, zarówno w czasie ich regeneracji, jak również po jej zakończeniu. Sirolimus w takim zastosowaniu miałby za zadanie ograniczenie przeżywalności komórek na powierzchni włókniny, co zmniejszyłoby prawdopodobieństwo powstania zrostu, który może być niebezpieczny dla zdrowia pacjenta. Lek ten może być bezpiecznie stosowany, ponieważ obecnie wykorzystuje się go w leczeniu restenozy. Jest zatem wprowadzany do implantów sercowo-naczyniowych w formie stentów [273]. Rapamycyna powinna uwalniać się bardzo powoli, w niewielkich dawkach, jednak przez dłuższy czas, który jest potrzebny do regeneracji tkanek w stopniu umożliwiającym powrót do podstawowej aktywności fizycznej, która jest czynnikiem utrudniającym tworzenie się zrostów. Ze względu na cytotoksyczność, lek ten nie powinien przedostać się do tkanek, będących w trakcie procesu

regeneracji, z tego względu wewnątrz struktury włókniny metodą elektrorozpylenia wytworzono litą membranę mającą na celu ograniczenie jego dyfuzji. Sól sodowa diklofenaku, uwalniając się po przeciwnej do sirolimusu stronie materiału, miałyby za zadanie ograniczenie bólu pooperacyjnego w miejscu przerwania ciągłości struktur biologicznych oraz zapobieganie powstawaniu stanów zapalnych przez pierwszy tydzień po implantacji. Ponadto, że włókniny otrzymane metodą elektroprzędzenia, ze względu na podobieństwo struktury do macierzy pozakomórkowej, sprzyjają proliferacji komórek, co może wspomagać proces gojenia [26]. Włókna uwalniające leki są skumulowane blisko powierzchni zewnętrznych włókniny, a ich udział wagowy maleje w kierunku jej środka. W odwrotny sposób rośnie zawartość nanowłókien modyfikatora, który odpowiada nie tylko za kontrolę nad szybkością uwalniania leków oraz degradacji matrycy, ale również ma zapewnić odpowiednie właściwości mechaniczne.

Opisana powyżej koncepcja stanowi przykład wykorzystania opracowanego sposobu kontrolowania szybkości uwalniania leków, i była przedmiotem badań *in vitro*, realizowanych w ramach niniejszej pracy. Wykorzystanie innych materiałów polimerowych oraz leków niż te, które zostały opisane, również jest możliwe, co zawarto w zgłoszeniu patentowym P.439042 (2021) „Sposób wytwarzania włókniny o regulowanym profilu uwalniania leku”.

Literatura

- [1] R. Singh, M.J. Bathaei, E. Istif, L. Beker, A Review of Bioresorbable Implantable Medical Devices: Materials, Fabrication, and Implementation, *Adv. Healthc. Mater.* 9:18 (2020) 2000790. doi:10.1002/adhm.202000790
- [2] A.D. Goncalves, W. Balestri, Y. Reinwald, Biomedical Implants for Regenerative Therapies, [W:] P. Vizureanu, C.M.D.C.F. Botelho, *Biomaterials*, London: IntechOpen (2020) 1-2. doi: 10.5772/intechopen.91295
- [3] M.R. Major, V.W. Wong, E.R. Nelson, M.T. Longaker, G.C. Gurtner, The Foreign Body Response, *Plast. Reconstr. Surg.* 135:5 (2015) 1489–1498. doi:10.1097/prs.0000000000001193
- [4] V.R. Bharad, A.A. Sheikh, R.H. Kale, K.R. Biyani, An Updated Look at Implantable Drug Delivery Systems, *J. Pharma. Care Health Sys.* 9:2 (2022) 1000244. DOI:10/35248/2376-0419.2022.244
- [5] A. Santos, M. Sinn Aw, M. Bariana, T. Kumeria, Y. Wang, D. Losic, Drug-releasing implants: current progress, challenges and perspectives, *J. Mater. Chem. B*, 2:37 (2014) 6157–6182. doi:10.1039/c4tb00548a
- [6] D. Das, Z. Zhang, T. Winkler, M. Mour, C. Gunter, M. Morlock, H.G. Machens, A.F. Schilling, Bioresorption and degradation of biomaterials, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 126 (2012) 317-333. doi:10.1007/10_2011_119.
- [7] G. Jiang, D.D. Zhou, Technology advances and challenges in hermetic packaging for implantable medical devices. [W]: D.D. Zhou, E.S. Greenbaum, *Implantable neural prostheses 2: techniques and engineering approaches*. Berlin: Springer, (2010) 28-29. DOI10.1007/978-0-387-98120-8_2
- [8] K. Ganesh, S. Yang, S. Schillace, V. Vita, Y. Wang, K.F. Ehmann, P. Guo, A review of manufacturing techniques for subcutaneous drug delivery implants, *Procedia CIRP* 110 (2022) 329-334. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2022.06.059>
- [9] S.H. Gray, M.T. Hawn, K.M.F. Itani, Surgical progress in inguinal and ventral incisional hernia repair, *Surg. Clin. North Am.* 88 (2008) 17-26. doi: 10.1016/j.suc.2007.11.007.
- [10] P. Wozniowska, P. Golaszewski, P. Pawluszewicz, H.R. Hady, Inguinal hernias – the review of literature, *Post. N. Med.* XXXI 5 (2018) 287-291. DOI: 10.25121/PNM.2018.31.5.287
- [11] J.T. Jenkins, P.J. O'Dwyer, Inguinal hernias, *BMJ.* 336 (2008) 269-272. doi:10.1136/bmj.39450.428275.AD
- [12] M. Plencner, E. Prosecká, M. Rampichová, B. East, M. Buzgo, L. Vysloužilová, J. Hoch, E. Amler, Significant improvement of biocompatibility of polypropylene mesh for incisional hernia repair by using poly-ε-caprolactone nanofibers functionalized with thrombocyte-rich solution, *Int. J. Nanomed.* 10:1 (2015) 2635-2646. <https://doi.org/10.2147/IJN.S77816>
- [13] B. Lau, H. Kim, P.I. Haihg, T. Tejriran, Obesity increases the odds of acquiring and incarcerating noninguinal abdominal wall hernias, *Am. Surg.* 78:10 (2012) 1118-1121. <https://doi.org/10.1177/000313481207801024>
- [14] S. Kalaba, E. Gerhard, J.S. Winder, E.M. Pauli, R.S. Haluck, J. Yang, Design strategies and applications of biomaterials and devices for Hernia repair, *Bioact. Mater.* 1:1 (2016) 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.05.002>.
- [15] K. Lockhart, D. Dunn, S. Teo, J.Y. Ng, M. Dhillon, E. Teo, M.L. Driel, Mesh versus non-mesh for inguinal and femoral hernia repair, *Cochrane Database Synt. Rev.* 9 (2018) 1-101. DOI: 10.1002/14651858.CD011517.pub2.
- [16] C. Wang See, T. Kim, D. Zhu, Hernia Mesh and Hernia Repair: A Review, *Eng. Regen.* 1 (2020) 19-33. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.05.002>
- [17] K. Baylón, P. Rodriguez-Camarillo, A. Elias-Zuniga, J.A. Diaz-Elizondo, R. Gilkerson, K. Lozano, Past, Present and Future of Surgical Meshes: A Review, *Membranes* 7:47 (2017) 1-23. doi:10.3390/membranes7030047
- [18] R. Douglas Matthews, L. Neumayer, Inguinal hernia in the 21st century: an evidence-based review, *Curr. Probl. Surg.* 45:4 (2008) 261-321. doi:10.1067/j.cpsurg.2008.01.002
- [19] C. Labay, J.M. Canal, M. Modic, U. Cvelbar, M. Quiles, M. Armengol, M.A. Arbos, F.J. Gil, C. Canal, Antibiotic-loaded polypropylene surgical meshes with suitable biological behaviour by plasma

- functionalization, and polymerization, *Biomater.* 71 (2015) 132-144. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.023>.
- [20] M.T. Wolf, C.A. Carruthers, C.L. Dearth, P.M. Carpo, A. Huber, O.A. Burns, R. Londono, S.A. Johnson, K.A. Daly, E.C. Stahl, J.M. Freund, C.J. Medberry, L.E. Carey, A. Nieponice, N.J. Amoroso, S.F. Badylak, Polypropylene surgical mesh coated with extracellular matrix mitigates the host foreign body response, *J. Biomed. Mater. Res.* 102:1 (2014) 234-246. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34671>
- [21] P. Avetta, R. Nisticó, M.G. Faga, D. D'Angelo, E.A. Boot, R. Lamberti, S. Martorana, P. Calza, D. Fabbri, G. Magnacca, Hernia-repair prosthetic devices functionalised with chitosan and ciprofloxacin coating: Controlled release and antibacterial activity, *J. Mater. Chem. B* 2:32 (2014) 5287-5294. DOI 10.1039/c4tb00236a
- [22] J. Chakroff, D. Kayuha, M. Henderson, J. Johnson, Development and Characterization of Novel Electrospun Meshes for Hernia Repair, *SOJ Mater. Sci. Eng.* 3:1 (2015) 1-9. <http://dx.doi.org/10.15226/sojmse.2015.00114>
- [23] W. Badiou, J.P. Lavigne, P.J. Bousquet, D. O'Callaghan, P. Mares, R. de Tayrac, In vitro and in vivo assessment of silver-coated polypropylene mesh to prevent infection in a rat model, *Int. Urogynecol. J.* 22 (2011) 265–272. <https://doi.org/10.1007/s00192-010-1330-y>
- [24] M. Fernandez-Gutierrez, E. Olivares, G. Pascual, J.M. Bellon, J. San Román, Low-density polypropylene meshes coated with resorbable and biocompatible hydrophilic polymers as controlled release agents of antibiotics, *Acta Biomater.* 9:4 (2013) 6006-6018. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.12.012>.
- [25] D.H. Ballard, U. Jammalamadaka, K. Tappa, J.A. Weisman, C.J. Boyer, J.S. Alexander, P.K. Woodard, 3D printing of surgical hernia meshes impregnated with contrast agents: in vitro proof of concept with imaging characteristics on computed tomography, *3D Print. Med.* 4:13 (2018) 1-6. <https://doi.org/10.1186/s41205-018-0037-4>
- [26] M. Keshvardoostchokami, S.S. Majidi, P. Huo, P. Ramachandran, M. Chen, B. Liu, Electrospun Nanofibers of Natural and Synthetic Polymers as Artificial Extracellular Matrix for Tissue Engineering, *Nanomater.* 11:21 (2020) 1-23. <https://doi.org/10.3390/nano11010021>
- [27] R. Jakubova, A. Mickova, M. Buzgo, M. Rampichova, E. Prosecka, D. Tvrdik, E. Amler Immobilization of thrombocytes on PCL nanofibres enhances chondrocyte proliferation in vitro, *Cell Prolif.* 44 (2011) 183-191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2011.00737.x>
- [28] A. Drengk, A. Zapf, E.K. Stürmer, K.M. Stürmer, K.H. Frosch, Influence of Platelet-Rich Plasma on Chondrogenic Differentiation and Proliferation of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells, *Cells Tissues Organs* 189 (2009) 317-326. doi: 10.1159/000151290
- [29] S.N.S.H. Chittajallu, A. Richhariya, K.M. Tse, V.A. Chinthapenta, Review on Damage and Rupture Modelling for Soft Tissues *Bioeng.* 9:26 (2022) 1-35. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9010026>
- [30] S. Schleifenbaum, M. Schmidt, R. Möbius, T. Wolfskamp, Ch. Schroder, R. Grunert, N. Hammer, Load and failure behavior of human muscle samples in the context of proximal femur replacement, *BMC Musculoskelet. Disord.* 17:149 (2016) 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-0998-7>
- [31] C.R. Deeken, S.P. Lake, Mechanical properties of the abdominal wall and biomaterials utilized for hernia repair, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 74 (2017) 411-427. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.05.008>.
- [32] C.N. Brown, J.G. Finch, Which mesh for hernia repair? *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 92 (2010) 272–278. DOI: 10.1308/003588410X12664192076296
- [33] U. Klinge, B. Klosterhalfen, V. Schumpelick, Foreign Body Reaction to Meshes of Used for the Repair of Abdominal Wall Hernias, *Eur. J. Surg.* 165 (1999) 665–673. DOI: 10.1080/11024159950189726
- [34] P. Gaur, A. Chawla, K. Verma, S. Mukherjee, S. Lalvani, R. Malhotra, Ch. Mayer, Characterization of Human Diaphragm at High Strain Rate Loading, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 60 (2016) 603-616. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.02.031>

-
- [35] C. Jacquemond, K. Bruyere-Garnier, M. Coret, Methodology do determine failure characteristics of planar soft tissues using a dynamic tensile test, *J. Biomech.* 40 (2007) 468-475. doi:10.1016/j.jbiomech.2005.12.010
- [36] T. Förstemann, J. Trzewik, J. Holste, B. Batke, M.A. Konerding, T. Wolloscheck, C. Hartung, Forces and deformations of the abdominal wall—A mechanical and geometrical approach to the linea alba, *J. Biomech.* 44:4 (2011) 600-606. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.11.021>.
- [37] H. Ben Abdelounis, S. Nicolle, M. Otténio, P. Beillas, D. Mitton, Effect of two loading rates on the elasticity of the human anterior rectus sheath, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 20 (2013) 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.12.002>.
- [38] A. Rath, J. Zhang, J. Chevrel, The sheath of the rectus abdominis muscle: an anatomical and biomechanical study. *Hernia* 1 (1997) 139–142. <https://doi.org/10.1007/BF02426420>
- [39] M. Kirilova, S. Stoytchev, D. Pashkouleva, V. Kavardzhikov, Experimental study of the mechanical properties of human abdominal fascia, *Med. Eng. Phys.* 33:1 (2011) 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2010.07.017>.
- [40] M.N. Helemus, K. Tweden, Materials selection, [W:] D.L. Wise, D.J. Trantolo, D.E. Altobelli et. al., *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Marcel Dekker, New York (1995) 27-59.
- [41] B. Świeczko-Żurek, *Biomateriały*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2009, 32-36. ISBN 978-83-7348-272-2
- [42] B.D. Ratner, Biomaterials: Been There, Done That, and Evolving into the Future, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 21 (2019) 171-191. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117120940>
- [43] M.F. Maitz, Applications of synthetic polymers in clinical medicine, *Biosuf. Biotribol.* 1 (2015) 161-176. <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>
- [44] D. Puppi, F. Chiellini, M. Dash, E. Chiellini, Biodegradable Polymers for Biomedical Application, [W:] G.P. Felton, *Biodegradable Polymers: Processing, Degradation and Applications*, Nova Science Publishers, New York (2011) 545-604. ISBN-13 978-1612095349ay
- [45] P.K. Deb, S.F. Kokaz, S.N. Abed, A. Paradkar, R.K. Tekade, Pharmaceutical and Biomedical Applications of Polymers, [W:] R.K. Tekade, *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, Basic Fundamentals of Drug Delivery*, Academic Press (2019) 204-208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00006-6>
- [46] K.A. Chaffin, Longevity Expectations for Polymers in Medical Devices Demand New Approaches to Evaluating Their Biostability, *ACS Macro Lett.* 9:12 (2020) 1793–1798. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.0c00685>
- [47] P. Shinde, M. Patil, A. Patil, Methods, Types and Applications of Pharmaceutical Polymers, *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 6:8 (2017) 784-797. DOI:10.20959/WJPPS20178-9854
- [48] W.H. Chen, Q.W. Chen, Q. Chen, Biomedical polymers: synthesis, properties, and applications. *Sci. China Chem.* 65 (2022) 1010–1075. <https://doi.org/10.1007/s11426-022-1243-5>
- [49] A. Tathe, M. Ghodke, A.P. Nikalje, A Brief Review: Biomaterials and Their Application, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2:4 (2010) 19-23.
- [50] A. Alsaadi, S.S.K. Ganesen, T.S.M. Amelia, R. Moanis, E. Peeters, S. Vigneswari, K. Bhubalan, Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolymer Synthesis by Marine Bacteria of the Malaysian Coral Triangle Region and Mining for PHA Synthase Genes, *Microorganisms* 10:2057 (2022) 1-17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102057>
- [51] C. Guindani, P. Dozoretz, J.G. Veneral, D.M. da Silva, P.H.H. Araújo, S.R.S. Ferreira, D. de Oliveira, Enzymatic ring opening copolymerization of globalide and ϵ -caprolactone under supercritical conditions, *J. Supercrit. Fluids* 128 (2017) 404–411. doi:10.1016/j.supflu.2017.06.008

-
- [52] A.C. Albertsson, I.V. Varma, Aliphatic polyesters: Synthesis, properties and applications, [W:] A.C. Albertsson, *Advances in Polymer Science*. Volume 157. Degradable Aliphatic Polyesters, Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2002 1-40. DOI10.1007/3-540-45734-8_1
- [53] A.P. Dove, Organic Catalysis for Ring-Opening Polymerization, *ACS Macro Lett.* 1 (2012) 1409-1412. <https://doi.org/10.1021/mz3005956>
- [54] T. Urbanek, E. Jager, A. Jager, M. Hruby, Selectively Biodegradable Polyesters: Nature-Inspired Construction Materials for Future Biomedical Applications, *Polymers* 11:6 (2019) 1061-1082. <https://doi.org/10.3390/polym11061061>
- [55] N. Murthy, S. Wilson, J.C. Sy, Biodegradation of polymers. [W:] K. Matyjaszewski, M. Möller, *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, Amsterdam, Holandia (2012) 547–560. DOI 10.1016/B978-0-444-53349-4.00240-5
- [56] Z. Gan, Q. Liang, J. Zhang, X. Jing, Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases, *Polym. Degrad. Stab.* 56:2 (1997) 209-213. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(96\)00208-X](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(96)00208-X).
- [57] A. Rosato, A. Romano, G. Totaro, A. Celli, F. Fava, G. Zanaroli, L. Sisti, Enzymatic Degradation of the Most Common Aliphatic Bio-Polyesters and Evaluation of the Mechanisms Involved: An Extended Study, *Polymers* 14: 1850 (2022) 1-24. <https://doi.org/10.3390/polym14091850>
- [58] J. Rydz, W. Sikorska, M. Kyilavska, D. Christova, Polyester-Based (Bio)degradable Polymers as Environmentally Friendly Materials for Sustainable Development, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 564-596. doi:10.3390/ijms16010564
- [59] M. Bero, J. Kasperczyk, Z.J. Jedliński, Coordination polymerization of lactides, 1 Structure determination of obtained polymers, *Makromol. Chem.* 191 (1990) 2287-2296. doi:10.1002/macp.1990.021911007
- [60] C. Zhang, Biodegradable Polyesters: Synthesis, Properties and Applications, [W:] S. Fakirov, *Biodegradable Polyesters*, Wiley-VCH, Weinheim, Niemcy (2015) 1-19. ISBN: 978-3-527-33086-7
- [61] E. Castro-Aguirre, F. Iñiguez-Franco, H. Samsudin, X. Fang, R. Auras, Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107 (2016) 333–366. doi:10.1016/j.addr.2016.03.010
- [62] P. Ruślikowski, A. Gadomska-Gajadur, Polilaktyd w zastosowaniach medycznych, *Tworzywa sztuczne w przemyśle* 2 (2017) 32-35.
- [63] K. Budak, O. Sogut, U.A. Sezer, A review on synthesis and biomedical applications of polyglycolic acid, *J. Polym. Res.* 27(208) (2020) 1-19. <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02187-1>
- [64] A. Agrawal, S. Rellegadla, S. Jain, Biomedical applications of PLGA particles, [W:] A.M. Holban, A.M. Grumzescu, *Materials for Biomedical Engineering*, Elsevier (2019) 87–129. doi:10.1016/b978-0-12-816913-1.00004-0
- [65] H.O. Alsaab, F.D. Alharbi, A.S. Alhibs, N.B. Alanazi, B.Y. Alshehri, M.A. Saleh, F.S. Alshehri, M.A. Algarni, T. Almugateeb, M.N. Uddin, R.M. Alzhrani, PLGA-Based Nanomedicine: History of Advancement and Development in Clinical Applications of Multiple Diseases, *Pharm.* 14 (2022) 2728-2758. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122728>
- [66] V. Guarino, G. Gentile, L. Sorrentino, L. Ambrosio, Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* (2017) 1–36. doi:10.1002/0471440264.pst658
- [67] S. Hossain, F. Mohamed, M.A.M. Shafri, Poly(trimethylene carbonate-co-caprolactone): An emerging drug delivery nanosystem in pharmaceuticals, *Biomater. Biomech. Bioeng.* 5:1 (2020) 65-86. <https://doi.org/10.12989/bme.2020.5.1.065>

-
- [68] T. Pivec, M.S. Smole, P. Gasparic, K.S. Kleinschek, Polyurethane for Medical Use, *Tekstilec* 60:4 (2017) 198-213. DOI: 10.14502/Tekstilec2017.60.00-00
- [69] E.M. Christenson, M. Dadsetan, M. Wiggins, J.M. Anderson, Poly(carbonate urethane) and poly(ester urethane) biodegradation: In vivo studies, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 69A:3 (2004) 407-416. DOI:10.1002/jbm.a.30002
- [70] S. Janiski, A. Fiebig, M. Sznitowska, *Farmacja stosowana: podręcznik dla studentów farmacji*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008, s. 719. ISBN 978-83-200-3778-4.
- [71] R. Brus, A. Danysz, Z. Kleinrok, *Podstawy farmakologii dla lekarzy, farmaceutów i studentów medycyny*, Wrocław: Wydaw. Volumed, 1996. ISBN 83-85564-26-8.
- [72] A.B. Morrison, J.A. Campbell, Tablet Disintegration and Physiological Availability of Drugs, *J. Pharm. Sci.* 54:1 (1965) 1–8. doi:10.1002/jps.2600540102
- [73] L.J. Edwards, The dissolution and diffusion of aspirin in aqueous media, *Transactions of the Faraday Society*, 47 (1951) 1191-1210. doi:10.1039/tf9514701191
- [74] C. MacLeod, H. Rabin, J. Ruedy, M. Caron, D. Zarowny, R.O. Davies, Comparative bioavailability of three brands of ampicillin, *Can. Med. Assoc. J.* 107:3 (1972) 203-209. PMID: 5052904 PMID: PMC1940893
- [75] J. Lindenbaum, M.H. Mellow, M.O. Blackstone, V.P. Butler, Variation in Biologic Availability of Digoxin from Four Preparations, *New England J. Med.* 285:24 (1971) 1344–1347. doi:10.1056/nejm197112092852403
- [76] E.J. Fraser, R.H. Leach, J.W. Poston, BIOAVAILABILITY OF DIGOXIN. *The Lancet*, 2:7776 (1972) 541. doi:10.1016/s0140-6736(72)91936-8
- [77] A. Dokoumetzidis, P. Macheras, A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System, *Int. J. Pharm.* 321:1-2 (2006) 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.011>
- [78] P.E. Macheras, M.Y. Symillides, Toward a quantitative approach for the prediction of the fraction of dose absorbed using the absorption potential concept, *Biopharm. Drug Disp.* 10:1 (1989) 43–53. doi:10.1002/bdd.2510100106
- [79] D.M. Oh, R.L. Curl, G.L. Amidon, Estimating the Fraction Dose Absorbed from Suspensions of Poorly Soluble Compounds in Humans: A Mathematical Model, *Pharm. Res.* 10:2 (1993) 264-270. DOI:10.1023/a:1018947113238
- [80] J.B. Dressman, G.L. Amidon, C. Reppas, V.P. Shah, *Pharm. Res.* 15:1 (1998) 11–22. doi:10.1023/a:1011984216775
- [81] E.M. Persson, A.S. Gustafsson, A.S. Carlsson, R.G. Nilsson, L. Knutson, P. Forsell, B. Abrahamsson, The Effects of Food on the Dissolution of Poorly Soluble Drugs in Human and in Model Small Intestinal Fluids, *Pharm. Res.* 22:12 (2005) 2141–2151. doi:10.1007/s11095-005-8192-x
- [82] R. Langer, New methods of drug delivery, *Science* 249:4976 (1990) 1527-1533. doi:10.1126/science.2218494.
- [83] D. Bhowmik, A. Singh, D. Gautam, K.P. Samapth Kumar, Immediate release drug delivery system – A novel drug delivery system, *J. Pharm. Biol. Sci.* 4:6 (2016) 197-202.
- [84] R.V. Kalaydina, K. Bajwa, B. Qorri, A. Decarlo, M.R. Szewczuk, Recent advances in “smart” delivery systems for extended drug release in cancer therapy, *Int. J. Nanomed.* 13 (2018) 4727-4745. <https://doi.org/10.2147/IJN.S168053>
- [85] M.P. Paarakh, P.A. Jose, C.M. Setty, G.V. Peter Christopher, Release kinetics – concepts and applications, *Int. J. Pharm. Res. Technol.* 8 (2018) 1-20. DOI:10.31838/ijprt/08.01.02
- [86] G. Singhvi, M. Singh, Review: In-Vitro Drug Release Characterization Models, *Int. J. Pharm. St. Res.* 2:1 (2011) 77-84.

-
- [87] B.M. Rayaprolu, J.J. Strawser, G. Anyarambhatla, Excipients in parental formulations: selection considerations and effective utilization with small molecules and biologics, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44:10 (2018) 1565-1571. DOI: 10.1080/03639045.2018.1483392
- [88] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S.K. Bannerejee, Drug delivery systems: An updated review, *Int. J. Pharm, Investig.* 2:1 (2012) 2-11. DOI: 10.4103/2230-973X.96920
- [89] C.G. Wilson, *The Need for Drugs and Drug Delivery Systems*, [W:] J. Siepmann, R. A. Siegel, M. J. Rathbone, *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, Springer, Berlin, Heidelberg, (2015) 15-16.
- [90] W. B. Liechty, D.R. Kryscio, B.V. Slaughter, N. A. Peppas, *Polymers for Drug Delivery Systems*, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 1 (2010) 149-173. doi:10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847.
- [91] D. Klose, F. Siepmann, E. Elkharraz, J. Siepmann, PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry, *Int. J. Pharm.* 354:1-2 (2008) 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.10.030>
- [92] R. Farazi, M.R. Vaezi, M.J. Molaei, M. Saeidifar, A.A Behnam-Ghader, Effect of pH and temperature on doxorubicin hydrochloride release from magnetite/graphene oxide nanocomposites, *Mater. Today: Proc.* 5:7-3 (2018) 15726-15732. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.04.184>.
- [93] M.S. Reza, M.A. Quadir, S.S. Haider, Comparative evaluation of plastic, hydrophobic and hydrophilic polymers as matrices for controlled-release drug delivery, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6:2 (2003) 282-91. PMID: 12935440.
- [94] B. Zhang, J. Nasereddin, T. McDonagh, D. von Zeppelin, A. Gleadall, F. Alqahtani, R. Bibb, P. Belton, S. Qi, Effects of porosity on drug release kinetics of swellable and erodible porous pharmaceutical solid dosage forms fabricated by hot melt droplet deposition 3D printing, *Int. J. Pharm.* 604 (2021) 120626. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120626>.
- [95] A. Geraili, M. Xing, K. Mequanint, Design and fabrication of drug-delivery systems toward adjustable release profiles for personalized treatment, *VIEW* 2:5 (2021) 20200126. <https://doi.org/10.1002/VIW.20200126>
- [96] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O.C. Farokhzad, Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release, *Chem. Rev.* 116 (2016) 2602-2663. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00346
- [97] J. Siepmann, R.A. Siegel, F. Siepmann, *Diffusion controlled drug delivery systems*, [W:] *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, Springer: Boston, MA, USA, (2012) 30-40.
- [98] J.B. Joiner, A. Prasher, I.C. Young, J. Kim, R. Shrivastava, P. Maturavongsadit, S.R. Benhabbour, Effects of Drug Physicochemical Properties on In-Situ Forming Implant Polymer Degradation and Drug Release Kinetics, *Pharmaceutics* 14:1188 (2022) 1-16. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061188>
- [99] C.E. Miles, A.D. Bernstein, T.M. Osborn Popp, N. Sanjeeva Murthy, A.J. Nieuwkoop, A.J. Gormley, Control of Drug Release from Microparticles by Tuning Their Crystalline Textures: A Structure-Activity Study, *ACS Appl. Polym. Mater.* 3 (2021) 6548-6561. <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c01254>
- [100] J.C. Jeong, J. Lee, K. Cho, Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Control. Release* 92:3 (2003) 249-258. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00367-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00367-5).
- [101] H.K. Sonam, A. Vimal, K. Kanchan, K. Vikash, Effect of Physicochemical Properties of Biodegradable Polymers on Nano Drug Delivery, *Polym. Rev.* 53:4 (2013) 546-567, DOI: 10.1080/15583724.2013.828751
- [102] S. Feng, L. Nie, P. Zou, J. Suo, Effects of drug and polymer molecular weight on drug release from PLGA-mPEG microspheres, *J. Appl. Polym. Sci.* 132:6 (2015) 1-8. <https://doi.org/10.1002/app.41431>

-
- [103] D.N. Venkatesh, S.N. Meyyanathan, A. Kovacevic, A. Zielińska, J. Fonseca, P. Eder, A. Dobrowolska, E.B. Souto, Effect of Hydrophilic Polymers on the Release Rate and Pharmacokinetics of Acyclovir Tablets Obtained by Wet Granulation: In Vitro and In Vivo Assays, *Molecules* 27 (2022) 1-17. <https://doi.org/10.3390/molecules27196490>
- [104] S. Zhuo, F. Zhang, J. Yu, X. Zhang, G. Yang, X. Liu, pH-Sensitive Biomaterials for Drug Delivery, *Molecules* 25:23 (2020) 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules25235649>
- [105] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, *Polymers (Basel)* 3:3 (2011) 1377-1397. doi:10.3390/polym3031377
- [106] N.N. Nyamweya, Applications of polymer blends in drug delivery, *Futur. J. Pharm. Sci.* 7:18 (2021) 1-15. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00167-2>
- [107] C. Busatto, J. Pesoa, I. Helbling, J. Luna, D. Estenoz, Effect of particle size, polydispersity and polymer degradation on progesterone release from PLGA microparticles: Experimental and mathematical modeling, *Int. J. Pharm.* 536:1 (2018) 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.006>.
- [108] J. Chen, N.E. Clay, N. Park, H. Kong, Non-spherical particles for targeted drug delivery, *Chem. Eng. Sci.* 125 (2015) 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.10.022>.
- [109] Ch.L. Jennings, T.D. Dziubla, D.A. Puleo, Combined Effects of Drugs and Plasticizers on the Properties of Drug Delivery Films, *J. Bioact. Compat. Polym.* 31:4 (2016) 323-333. doi:10.1177/0883911515627178.
- [110] B. Mikolaszek, J. Kazlauske, A. Larsson, M. Sznitowska, Controlled Drug Release by the Pore Structure in Polydimethylsiloxane Transdermal Patches, *Polymers* 12 (2020) 1-16. doi:10.3390/polym12071520
- [111] A. Matsumoto, Y. Matsukawa, Y. Horikiri, T. Suzuki, Rupture and drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(dl-lactide-coglycolide) and poly(dl-lactide). *Int. J. Pharm.* 327 (2006) 110-116. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.07.055
- [112] R.J. Seager, A.J. Acevedo, F. Spill, M.H. Zaman, Solid dissolution in a fluid solvent is characterized by the interplay of surface area-dependent diffusion and physical fragmentation, *Sci. Rep.* 8:7711 (2018) 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25821-x>
- [113] D.E. Wurster, P.W. Taylor, Dissolution Kinetics of Certain Crystalline Forms of Prednisolone, *J. Pharm. Sci.* 54:5 (1965) 670-676. doi:10.1002/jps.2600540503
- [114] S.K. Singh, K.K. Srinivasan, K. Gowthamarajan, D. Prakash, N.B. Gaikwad, D.S. Singare, Influence of formulation parameters on dissolution rate enhancement of glyburide using liquisolid technique, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38:8 (2012) 961-970. doi:10.3109/03639045.2011.634810
- [115] J.P. Icenhower, P.M. Dove, The dissolution kinetics of amorphous silica into sodium chloride solutions: effects of temperature and ionic strength, *Geochim. Cosmochim. Acta* 64:24 (2000) 4193-4203. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00487-7](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00487-7).
- [116] M. Sokić, B. Marković, S. Stanković, Ž. Kamberović, N. Štrbac, V. Manojlović, N. Petronijević, Kinetics of Chalcopyrite Leaching by Hydrogen Peroxide in Sulfuric Acid. *Metals* 9:11:1173 (2019) 1-13. <https://doi.org/10.3390/met9111173>
- [117] A. Fedoročková, P. Raschman, Effects of pH and acid anions on the dissolution kinetics of MgO, *Chem. Eng. J.* 143:1-3 (2008) 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.04.029>.
- [118] L. Jones, P. Atkins, *Chemia ogólna. Cząsteczki, Materia, Reakcje*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2018) 553-555.
- [119] P.A. Small, Some factors affecting the solubility of polymers, *J. Appl. Chem.* 3:2 (2007) 71-80. doi:10.1002/jctb.5010030205
- [120] N. Kubantseva, R.W. Hartel, P.A. Swearingen, Factors Affecting Solubility of Calcium Lactate in Aqueous Solutions, *J. Dairy Sci.* 87:4 (2004) 863-867. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73230-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73230-0).

-
- [121] S. Szczeniowski, *Fizyka doświadczalna, Część II Ciepło i Fizyka Drobinowa*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa (1964) 261-267.
- [122] R.P. Feynman, R.B. Leighton, M. Sands, *Feynmana Wykłady z Fizyki, Tom 1 - Część 2*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa (1969) 271-274.
- [123] D. Matuszak, G.L. Aranovich, M.D. Donohue, Thermodynamic Driving Force for Molecular Diffusion – Lattice Density Functional Theory Predictions. *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics*, 31:4 (2006) 355-384. doi:10.1515/jnetdy.2006.015
- [124] Y. Cu, W.M. Saltzman, Mathematical modeling of molecular diffusion through mucus, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61:2 (2009) 101-114. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.006>.
- [125] W.I. Higuchi, Diffusional Models Useful in Biopharmaceutics Drug Release Rate Process, *J. Pharm. Sci.* 56:3 (1967) 315-324. <https://doi.org/10.1002/jps.2600560302>
- [126] N. Rohman, T. Mohiuddin, K. Ahmed, I. Khan, A.A. Skelton, Derivation of the pH-Dependent Higuchi Equation, *Insights Chem. Biochem.* 2:3 (2022) 1-3. DOI:10.33552/ICBC.2022.02.000538
- [127] R.A. Aldeeb, M.F. El-Miligi, M. El-Nabarawi, R. Tag, H.M.S. Amin, A.A. Taha, Enhancement of the Solubility and Dissolution Rate of Telmisartan by Surface Solid Dispersions Employing Superdisintegrants, Hydrophilic Polymers and Combined Carriers, *Sci. Pharm.* 90:71 (2022) 1-17. <https://doi.org/10.3390/scipharm90040071>
- [128] W. Nernst, Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. *Z. Phys. Chem.* 47 (1904) 52–55. <https://doi.org/10.1515/zpch-1904-4704>
- [129] A.A. Noyes, W.R. Whitney, The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 19 (1897) 930–934. <https://doi.org/10.1021/ja02086a003>
- [130] M. Wilderman, Über die geschwindigkeit molekularer und chemischer reaktionen in heterogenen systemen, Erster Teil. *Z. Phys. Chem.* 66 (1909) 445-495.
- [131] P.V. Danckwerts, Significance of liquid-film coefficients in gas absorption. *Ind. Eng. Chem.* 43 (1951) 1460–1467. <https://doi.org/10.1021/ie50498a055>
- [132] R.A. Siegel, M.J. Rathbone, Overview of Controlled Release Mechanisms, [W:] J. Siepmann, R. A. Siegel, M. J. Rathbone, *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials, Springer, Berlin, Heidelberg, (2012) 35-37. DOI 10.1007/978-1-4614-0881-9
- [133] L. Zhang, J. Alfano, D. Race, R.N. Dave, Zero-order release of poorly water-soluble drug from polymeric films made via aqueous slurry casting, *Eur. J. Pharm. Sci.* 30:117 (2018) 245–254. doi:10.1016/j.ejps.2018.02.029.
- [134] G. Soni, K.S. Yadav, High encapsulation efficiency of poloxamer-based injectable thermoresponsive hydrogels of etoposide, *Pharm. Dev. Technol.* 19:6 (2014) 651–661. DOI: 10.3109/10837450.2013.819014
- [135] J. Mzoughi, T. Vandamme, V. Luchnikov, Biphasic Drug Release from Rolled-Up Gelatin Capsules with a Cylindrical Cavity, *Pharmaceutics* 13 (2021) 1-10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122040>
- [136] M. Musiał-Kulik, J. Włodarczyk, M. Stojko, P. Karpeta-Jarząbek, M. Pastusiak, H. Janeczek, J. Kasperczyk, Bioresorbable, electrospun nonwoven for delayed and prolonged release of temozolomide and nimorazole, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 161 (2021) 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.02.001>.
- [137] J. He, Ch. Zhong, J. Mi, Modeling of Drug Release from Bioerodible Polymer Matrices, *Drug Deliv.* 12:5 (2005) 251-259. DOI: 10.1080/10717540500176043
- [138] T. Wang, C. Zhang, W. Zhong, X. Yang, A. Wang, R. Liang, Modification of Three-Phase Drug Release Mode of Octreotide PLGA Microspheres by Microsphere-Gel Composite System, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 20:228 (2019) 1-14. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1438-4>
- [139] J. Yoo, Y.Y. Won, Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020) 6053–6062. <https://dx.doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01228>

-
- [140] N.A. Peppas, B. Narasimhan, Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems, *J. Control. Release* 190 (2014) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.041>
- [141] J. Siepmann, N.A. Peppas, Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 163-174. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.028>.
- [142] 5 - Mathematical models of drug release, [W:] M.L. Bruschi, *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Woodhead Publishing (2015) 63-86. ISBN 9780081000922, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.
- [143] P. Trucillo, Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release, *Processes* 10:1094 (2022) 1-24. <https://doi.org/10.3390/pr10061094>
- [144] C. Mircioiu, V. Voicu, V. Anuta, A. Tudose, C. Celia, D. Paolino, I. Mircioiu, Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 11:140 (2019) 1-45. doi:10.3390/pharmaceutics11030140
- [145] J. Bhasarkar, D. Bal, Kinetic investigation of a controlled drug delivery system based on alginate scaffold with embedded voids, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 17:2 (2019) 228080001881746. doi:10.1177/2280800018817462
- [146] Y.N. Zhao, J. Gu, S. Jia, Y. Guan, Y. Zhang, Zero-order release of polyphenolic drugs from dynamic, hydrogen-bonded LBL films, *Soft Matter* 12:4 (2016) 1085–1092. doi:10.1039/c5sm02186c
- [147] K.R. Vijaya Rani, S. Rajan, M. Bhupathyaaraj, R.K. Priya, N. Halligudi, M.A. Al-Ghazali, S.B. Sridhar, J. Shareef, S. Thomas, S.M. Desai, The Effect of Polymers on Drug Release Kinetics in Nanoemulsion In Situ Gel Formulation, *Polymers* 14:3 (2022) 427-440. <https://doi.org/10.3390/polym14030427>
- [148] D. Sendil, D.L. Wise, V. Hasirci, Assessment of biodegradable controlled release rod systems for pain relief applications, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 13:1 (2002) 1–15. doi:10.1163/156856202753525891
- [149] M. Gibaldi, S. Feldman, Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to non-disintegrating dosage forms, *J. Pharm. Sci.* 56:10 (1967) 1238–1242. doi:10.1002/jps.2600561005
- [150] R. Gouda, H. Baishya, Z. Qing, Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets, *J. Develop. Drugs* 6:2 (2017) 1-8. DOI:10.4172/2329-6631.1000171
- [151] N.V. Mulye, S.J. Turco, A Simple Model Based on First Order Kinetics to Explain Release of Highly Water Soluble Drugs from Porous Dicalcium Phosphate Dihydrate Matrices, *Drug Develop. Indust. Pharm.* 21:8 (1995) 943–953. doi:10.3109/03639049509026658
- [152] T. Higuchi, Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension, *J. Pharm. Sci.* 50:10 (1961) 874–875. doi:10.1002/jps.2600501018
- [153] T. Higuchi, Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci.* 52:12 (1963) 1145–1149. doi:10.1002/jps.2600521210
- [154] P. Costa, J.M. Sousa Lobo, Evaluation of Mathematical Models Describing Drug Release from Estradiol Transdermal Systems, *Drug Develop. Indust. Pharm.* 29:1 (2003) 89–97. doi:10.1081/ddc-120016687
- [155] A.W. Hixson, J.H. Crowell, Dependence of reaction velocity upon surface and agitation, *Ind. Eng. Chem.* 23 (1931) 923–931. <https://doi.org/10.1021/ie50260a018>
- [156] S. Chen, J. Zhu, J. Cheng, Preparation and in vitro evaluation of a novel combined multiparticulate delayed-onset sustained-release formulation of diltiazem hydrochloride, *Pharmazie*. 62:12 (2007) 907-13. doi:10.1691/ph.2007.12.6119
- [157] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Inter. J. Pharm.* 15:1 (1983) 25–35. doi:10.1016/03785173(83)90064-9

-
- [158] H. Kim, R. Fassihi, Application of Binary Polymer System in Drug Release Rate Modulation. 2. Influence of Formulation Variables and Hydrodynamic Conditions on Release Kinetics, *J. Pharm. Sci.* 86:3 (1997) 323–328. doi:10.1021/js960307p
- [159] J.L. Ford, K. Mitchell, P. Rowe, D.J. Armstrong, P.N.C. Elliott, C. Rostron, J.E. Hogan, Mathematical modelling of drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices: Effect of temperature, *Inter. J. Pharm.* 71:1-2 (1991) 95–104. doi:10.1016/0378-5173(91)90071-u
- [160] I. Permanadewi, A.C. Kumoro, D.H. Wardhani, N. Aryanti, Modelling of controlled drug release in gastrointestinal tract simulation. *J. Phys. Conf. Ser.* 1295 (2019) 012063. doi:10.1088/1742-6596/1295/1/012063
- [161] K. Gallagher, O. Corrigan, Mechanistic aspects of the release of levamisole hydrochloride from biodegradable polymers, *J. Control. Rel.* 69:2 (2000) 261–272. doi:10.1016/s0168-3659(00)00305-9
- [162] C. González, R. Simpson, O. Vega, V. de Campo, M. Pinto, L. Fuentes, C. Ramírez, Effect of particle size on in vitro intestinal digestion of emulsion-filled gels: Mathematical analysis based on the Gallagher-Corrigan model. *Food Bioprod. Process.* 120 (2019) 33-40. doi:10.1016/j.fbp.2019.12.009
- [163] J. Balcerzak, M. Mucha, Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of polylactide-chitosan, *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.* 15 (2010) 118-126.
- [164] H.B. Hopfenberg, Controlled release from erodible slabs, cylinders, and spheres, *Controlled Release Polymeric Formulations*, Washington, ACS Symposium Series vol. 33, American Chemical Society (1976) 26-31.
- [165] I. Katzhendler, A. Hoffman, A. Goldberger, M. Friedman, Modeling of Drug Release from Erodible Tablets, *J. Pharm. Sci.* 86:1 (1997) 110–115. doi:10.1021/js9600538
- [166] J. Siepmann, R.A. Siegel, F. Siepmann, Diffusion controlled drug delivery systems. [W:] *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, Springer: Boston, MA, USA (2012) 127–152.
- [167] S. KITAZAWA, I. JOHNO, Y. ITO, S. TERAMURA, J. OKADA, Effects of hardness on the disintegration time and the dissolution rate of uncoated caffeine tablets, *J. Pharm. Pharmacol.* 27:10 (1975) 765–770. doi:10.1111/j.2042-7158.1975.tb09397.x
- [168] F. Langenbucher, Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution, *J. Pharm. Pharmacol.* 24:12 (1972) 979–981. doi:10.1111/j.2042-7158.1972.tb08930.x
- [169] R.W. Baker, H.S. Lonsdale, Controlled release: mechanisms and rates. [W:] A.C. Taquary, R.E. Lacey, *Controlled Release of Biologically Active Agents*. New York: Plenum Press (1974) 15-71.
- [170] J. Li, J.D. Gu, L. Pan, Transformation of dimethyl phthalate, dimethyl isophthalate and dimethyl terephthalate by *Rhodococcus ruber* Sa and modeling the processes using the modified Gompertz model, *Int. Biodeterior. Biodegradation* 55:3 (2005) 223–232. doi:10.1016/j.ibiod.2004.12.003
- [171] D.O. Cooney, Effect of geometry on the dissolution of pharmaceutical tablets and other solids: Surface detachment kinetics controlling, *AIChE Journal*, 18:2 (1972) 446–449. doi:10.1002/aic.690180234
- [172] H. Li, R.J. Hardy, X. Gu, Effect of Drug Solubility on Polymer Hydration and Drug Dissolution from Polyethylene Oxide (PEO) Matrix Tablets. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 9:2 (2008) 437–443. doi:10.1208/s12249-008-9060-x
- [173] A. Kumar, K.K. Sawant, Application of multiple regression analysis in optimization of anastrozole-loaded PLGA nanoparticles, *J. Microencapsul.* 31:2 (2013) 105–114. doi:10.3109/02652048.2013.808280
- [174] K. Kosmidis, G. Dassios, Monte Carlo simulations in drug release. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 46:2 (2019) 165-172. doi:10.1007/s10928-019-09625-8
- [175] V. Sutariya, A. Groshev, P. Sadana, D. Bhatia, Y. Pathak, Artificial Neural Network in Drug Delivery and Pharmaceutical Research, *Open Bioinforma. J.* 7:1-M5 (2013) 49-62. DOI: 10.2174/1875036201307010049

-
- [176] S. He, L.G. Leanse, Y. Feng, Artificial intelligence and machine learning assisted drug delivery for effective treatment of infectious diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 178 (2021) 113922. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113922>
- [177] A. Gopferich, Mechanisms of polymer degradation and erosion, *Biomater.* 17:2 (1996) 103-114. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85755-3](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85755-3)
- [178] N. Abbasi, R.S.B. Lee, S. Ivanovski, R.M. Love, S. Hamlet, In vivo bone regeneration assessment of offset and gradient melt electrowritten (MEW) PCL scaffolds, *Biomater. Res.* 24:17 (2020) 1-24. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00196-1>
- [179] W. Hui-Min, C. Yi-Ting, W. Zhi-Hong, W. Zhao-Ren, C. Chun-Hong, H. Mei-Ling, Novel Biodegradable Porous Scaffold Applied to Skin Regeneration, *PLoS ONE* 8:6 (2013) 0056330. doi:10.1371/journal.pone.0056330
- [180] H. Tamai, K. Igaki, E. Kyo, K. Kosuga, A. Kawashima, S. Matsui, H. Komori, T. Tsuji, S. Motohara, H. Uehata, Initial and 6-Month Results of Biodegradable Poly-/Lactic Acid Coronary Stents in Humans, *Circulation* 102:4 (2000) 399-404. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.4.399>
- [181] R. Naseem, L. Zhao, V. Silberschmidt, Y. Liu, O. Scaife, H. Willcock, S. Eswaran, S. Hossainy, Mechanical and chemical characterization of bioresorbable polymeric stent over two-year in vitro degradation, *J. Biomater. Appl.* 34:1 (2019) 61-73. <https://doi.org/10.1177/0885328219839591>
- [182] J.C. Foster, I. Akar, M.C. Grocott, A.K. Pearce, R.T. Mathers, R.K. O'Reilly, 100th Anniversary of Macromolecular Science Viewpoint: The Role of Hydrophobicity in Polymer Phenomena, *ACS Macro Lett.* 9:11 (2020) 1700–1707. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.0c00645>
- [183] A. Chamas, H. Moon, J. Zheng, Y. Qiu, T. Tabassum, J.H. Jang, M. Abu-Omar, S.L. Scott, S. Suh, Degradation Rates of Plastics in the Environment, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8:9 (2020) 3494-3511. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
- [184] S. Ghatge, Y. Yang, J.H. Ahn, H.G. Hur, Biodegradation of polyethylene: a brief review, *Appl. Biol. Chem.* 63:27 (2020) 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00511-3>
- [185] Y. Wang, M.A. Murcia Valderrama, R.J. van Putten, C.J.E. Davey, A. Tietema, J.R. Parsons, B. Wang, G.J.M. Gruter, *Polymers* 14:15 (2022) 1-16. <https://doi.org/10.3390/polym14010015>
- [186] F. Zhang, Y. Zhao, D. Wang, M. Yan, J. Zhang, P. Zhang, T. Ding, L. Chen, C. Chen, Current technologies for plastic waste treatment: A review, *J. Clean. Prod.* 282:124523 (2021) 1-68. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124523>
- [187] G.H. Bhuvaneswari, 3-Degradability of Polymers, [W:] T. Sabu, R. Vasudeo, K. Krishnan, V.K. Abitha, G.T. Martin, *Plastics Design Library, Recycling of Polyurethane Foams*, William Andrew Publishing, (2018) 29-44. ISBN 9780323511339, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51133-9.00003-6>
- [188] I. Castilla-Cortazar, J. Mas-Estelles, J.M. Mesenger-Duenas, J.L. Escobar Ivirico, B. Mari, A. Vidaurre, Hydrolytic and enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) network, *Polym. Degrad. Stab.* 97 (2012) 1241-1248. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.038>
- [189] M.T. Zumstein, D. Rechsteiner, N. Roduner, V. Perz, D. Ribitsch, G.M. Guebitz, H.P.E. Kohler, K. McNeill, M. Sander, Enzymatic hydrolysis of polyester thin films at the nanoscale: effects of polyester structure and enzyme active-site accessibility, *Environ. Sci. Technol.* 51:13 (2017) 7476-7485. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01330>
- [190] R.W. Lenz, *Biodegradable polymers*. [W:] R.S. Langer, N.A. Peppas, *Biopolymers I. Advances in Polymer Science*, Springer, Berlin, Heidelberg 107 (1993) 1-40. <https://doi.org/10.1007/BFb0027550>
- [191] T.G. Park, Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition, *Biomater.* 16:15 (1995) 1123–1130. doi:10.1016/0142-9612(95)93575-x

-
- [192] P. Alamán-Díez, E. García-Gareta, P.F. Napal, M. Arruebo, M.A. Pérez, In Vitro Hydrolytic Degradation of Polyester-Based Scaffolds under Static and Dynamic Conditions in a Customized Perfusion Bioreactor, *Materials* 15:7 (2022) 2572. <https://doi.org/10.3390/ma15072572>
- [193] Q. Zhang, Y. Jiang, Y. Zhang, Y. Zhaoyang, W. Tan, M. Lang, Effect of porosity on long-term degradation of poly(ϵ -caprolactone) scaffolds and their cellular response, *Polym. Degrad. Stab.* 98:1 (2013) 209-218. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.10.008>
- [194] M.D. Rowe, E. Eyiler, K.B. Walters, Hydrolytic degradation of bio-based polyesters: Effect of pH and time, *Polym. Test.* 52 (2016) 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2016.04.015>
- [195] S. Gai, J. Xu, H. Zhang, R. Yin, W. Zhang, Effects of Nanofillers on the Hydrolytic Degradation of Polyesters, *Tissue Eng. Part B Rev.* 26:5 (2020) 484-495. DOI: 10.1089/ten.TEB.2019.0260
- [196] C. Park, E.Y. Kim, Y.T. Yoo, S.S. Im, Effect of Hydrophilicity on the Biodegradability of Polyesteramides, *J. Appl. Polym. Sci.* 90:10 (2003) 2708-2714. <https://doi.org/10.1002/app.12925>
- [197] S. Li, S. Girod-Holland, M. Vert, Hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid) in the presence of caffeine base, *J. Control. Release* 40 (1996) 41-53. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00138-7](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00138-7)
- [198] J.F. Fitzgerald, O.I. Corrigan, Investigation of the mechanisms governing the release of levamisole from poly-lactide-co-glycolide delivery systems, *J. Control. Release* 42:2 (1996) 125-132. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(96\)01450-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(96)01450-2)
- [199] X. Chen, C.P. Ooi, T.H. Lim, Effect of Ganciclovir on the Hydrolytic Degradation of Poly(lactide-co-glycolide) Microspheres, *J. Biomater. Appl.* 20:3 (2006) 287-302. DOI: 10.1177/0885328206054265
- [200] M. Musiał-Kulik, J. Kasperczyk, K. Jelonek, P. Dobrzyński, K. Gębarowska, H. Janeczek, M. Libera, The Influence of Paclitaxel on Hydrolytic Degradation in Matrices Obtained from Aliphatic Polyesters and Polyester Carbonates, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 67:6 (2010) 664-668.
- [201] G. Gorrasi, R. Pantani, Hydrolysis and Biodegradation of Poly(lactic acid), [W:] M. Di Lorenzo, R. Androsch, Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic acid), *Advances in Polymer Science Springer, Cham.* 279 (2017) 119-151. https://doi.org/10.1007/12_2016_12
- [202] G. Chouzouri, M. Xanthos, Degradation of Aliphatic Polyesters in the Presence of Inorganic Fillers, *J. Plast. Film Sheeting* 23:1 (2007) 19-36. doi:10.1177/8756087907076599
- [203] A. Andrzejewska, One Year Evaluation of Material Properties Changes of Polylactide Parts in Various Hydrolytic Degradation Conditions, *Polymers* 11 (2019) 1496; doi:10.3390/polym11091496
- [204] D.C. Franca, E.B. Bezerra, D.D.S. Morais, E.M. Araujo, R.M.R. Wellen, Effect of Hydrolytic Degradation on Mechanical Properties of PCL, *Mater. Sci. Forum* 869 (2016) 342-345. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.869.342>
- [205] H. Antheunis, J.C. van der Meer, M. de Geus, A. Heise, C.E. Koning, Autocatalytic Equation Describing the Change in Molecular Weight during Hydrolytic Degradation of Aliphatic Polyesters, *Biomacromol.* 11:4 (2010) 1118-1124. <https://doi.org/10.1021/bm100125b>
- [206] S. Li, Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic acid and glycolic acids, *J. Biomed. Mater. Res.* 48:3 (1999) 342-353. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(1999\)48:3<342::AID-JBM20>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(1999)48:3<342::AID-JBM20>3.0.CO;2-7)
- [207] G. Schliecker, C. Schmidt, S. Fuchas, R. Wombacher, T. Kissel, Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity, *Int. J. Pharm.* 266:1-2 (2003) 39-49. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00379-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00379-X)
- [208] J.A. Tamada, R. Langer, Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1993) 552-556. doi: 10.1073/pnas.90.2.552.

-
- [209] B. Laycock, M. Nikolić, J.M. Colwell, E. Gauthier, P. Halley, S. Bottle, G. George, Lifetime prediction of biodegradable polymers, *Prog. Polym. Sci.* 71 (2017) 144-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.02.004>
- [210] F. von Burkersroda, L. Schedl, A. Gopferich, Why degradable polymers undergo surface erosion and bulk erosion, *Biometer.* 23 (2002) 4221-4231. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00170-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00170-9)
- [211] J.W. Strutt (Lord Rayleigh), On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity, *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 14:87 (1882) 184-186. <https://doi.org/10.1080/14786448208628425>
- [212] J. Zeleny, The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring electrical intensity at their surfaces, *Phys. Rev.* 3:2 (1914) 69-91. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.3.69>
- [213] J. Zeleny, On the conditions of instability of electrified drops, with applications to the electrical discharge from liquid points, *Proc. Camb. Philos. Soc.: Math. Phys. Sci.* (1914) 71-83.
- [214] A. Formhals, Method and apparatus for the production of artificial fibers. US Patent 2158416. (1939).
- [215] K. Spurny, Nikolai Albertowich Fuchs 1895-1982, *Aerosol Sci. Technol.* 2:3 (1982) 301-302. <https://doi.org/10.1080/02786828308958635>
- [216] G. Taylor, Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. A: Math. Phys. Sci.* 208 (1964) 383-397. <https://doi.org/10.1098/rspa.1964.0151>
- [217] L. Larrondo, R.J. Manley, Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys. Ed.* 19 (1981) 909-20. DOI:10.1002/POL.1981.180190601
- [218] J. Parthenidas, I. Nikolakakis, I. Laidame, J. Heinamaki, A Mini-Review: Needleless Electrospinning of Nanofiber for Pharmaceutical and Biomedical Applications, *Processes* 8:673 (2020) 1-20. <https://doi.org/10.3390/pr8060673>
- [219] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, Y. Xia, Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials and Applications, *Chem. Rev.* 119:8 (2019) 5298-5415). DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00593
- [220] Y. Li, J. Zhu, H. Cheng, G. Li, H. Cho, M. Jiang, Q. Gao, X. Zhang, Developments of Advanced Electrospinning Techniques: A Critical Review, *Adv. Mater. Technol.* 6:11 (2021) 2100410. <https://doi.org/10.1002/admt.202100410>
- [221] J. Wang, J.A. Jansen, F. Yang, Electrospinning: Possibilities and Challenges of Engineering Carriers for Biomedical Applications—A Mini Review. *Frontiers in Chemistry*, 7:258 (2019) 1-9. doi:10.3389/fchem.2019.00258
- [222] A. Garkal, D. Kulkarni, S. Musale, T. Metha, P. Giram, Electrospinning nanofiber technology: a multifaceted paradigm in biomedical applications, *New J. Chem.* 45 (2021) 21508-21533. <https://doi.org/10.1039/D1NJ04159B>
- [223] Z. Li, C. Wang, One-Dimensional Nanostructures. *Electrospinning Technique Nanostructures*, Springer, New York (2013) 15-27. DOI 10.1007/978-3-642-36427-3
- [224] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 325-347. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
- [225] A. Haider, S. Haider, I.K. Kang, A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, *Arab. J. Chem.* 11 (2018) 1165-1188. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>
- [226] T. Subbiah, G.S. Bhat, R.W. Tock, S. Parameswaran, S.S. Ramakumar, Electrospinning of Nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.* 96 (2005) 557-569. DOI 10.1002/app.21481
- [227] K. Garg, G.L. Bowlin, Electrospinning jets and nanofibrous structures, *Biomicrofluid.* 5:013403 (2011) 1-19. <https://doi.org/10.1063/1.3567097>

-
- [228] G. Taylor, Electrically Driven Jets, *Proc. Roy. Soc. A: Math. Phys. Eng. Sci.* 313:1515 (1969) 453–475. doi:10.1098/rspa.1969.0205
- [229] D.H. Reneker, A.L. Yarin, Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, 49:10 (2008) 2387–2425. doi:10.1016/j.polymer.2008.02.002
- [230] W. Cui, X. Li, X. Zhu, G. Yu, S. Zhou, J. Weng, Investigation of Drug Release and Matrix Degradation of Electrospun Poly(DL-lactide) Fibers with Paracetamol Inoculation, *Biomacromol.* 7:5 (2006) 1623–1629. doi:10.1021/bm060057z
- [231] K. Acatay, E. Simsek, C. Ow-Yang, Y.Z. Menceloglu, Tunable, Superhydrophobically Stable Polymeric Surfaces by Electrospinning, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43:39 (2004) 5210–5213. doi:10.1002/anie.200461092
- [232] K.H. Lee, H.Y. Kim, M.S. Khil, Y.M. Ra, D.R. Lee, Characterization of nano-structured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning, *Polymer* 44:4 (2003) 1287–1294. doi:10.1016/s0032-3861(02)00820-0
- [233] Y. Liu, H. Jiang, Y. Li, K. Zhu, Control Of Dimensional Stability And Degradation Rate In Electrospun Composite Scaffolds Composed Of Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) And Poly(E-Caprolactone), *Chinese J. Polym. Sci.* 26:01 (2008) 63-71. <https://doi.org/10.1142/S0256767908002674>
- [234] Y. Dong, T. Yong, S. Liao, C.K. Chan, M.M. Stevens, S. Ramakrishna, Distinctive Degradation Behaviors of Electrospun Polyglycolide, Poly(DL-Lactide-co-Glycolide), and Poly(L-Lactide-co- ϵ -Caprolactone) Nanofibers Cultured With/Without Porcine Smooth Muscle Cells, *Tissue Eng. Part A* 16:1 (2010) 283–298. doi:10.1089/ten.tea.2008.0537
- [235] Y. Dong, S. Liao, M. Ngiam, C.K. Chan, S. Ramakrishna, Degradation Behaviors of Electrospun Resorbable Polyester Nanofibers, *Tissue Eng. Part B* 15:3 (2009) 333-351. DOI: 10.1089=ten.teb.2008.0619
- [236] N. Bölgen, Y.Z. Menceloğlu, K. Acatay, I. Vargel, E. Pişkin, In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 16:12 (2005) 1537–1555. doi:10.1163/156856205774576655
- [237] I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, M. Vert, Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence *Biomater.* 16:4 (1995) 305–311. doi:10.1016/0142-9612(95)93258-f
- [238] W. Cui, S. Li, S. Zhou, J. Weng, Degradation patterns and surface wettability of electrospun fibrous mats. *Polym. Degrad. Stab.* 93:3 (2008) 731–738. doi:10.1016/j.polymdegradstab.200
- [239] J. Zeng, X. Chen, Q. Liang, X. Xu, X. Jing, Enzymatic Degradation of Poly(L-lactide) and Poly(ϵ -caprolactone) Electrospun Fibers, *Macromol. Biosci.* 4:12 (2004) 1118–1125. doi:10.1002/mabi.200400092
- [240] S. Li, S. McCarthy Influence of Crystallinity and Stereochemistry on the Enzymatic Degradation of Poly(lactide)s, *Macromol.* 32:13 (1999) 4454–4456. doi:10.1021/ma990117b
- [241] D. Puppi, F. Chiellini, 12 - Drug release kinetics of electrospun fibrous systems, [W:] M. L. Focarete, A. Tampieri, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Core-Shell Nanostructures for Drug Delivery and Theranostics, Woodhead Publishing (2018) 349-374. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102198-9.00012-0>.
- [242] Q. Zheng, Z. Chu, X. Li, H. Kang, X. Yang, Y. Fan, Effects of Aqueous Medium, Tween-20 and Flow on the Stability of Sirolimus, *J. Mech. Med. Biol.* 17:02 (2017) 1750039. doi:10.1142/s0219519417500397
- [243] A. Kazek-Kęsik, J. Jaworska, M. Krok-Borkowicz, M. Gołda-Cępa, M. Pastusiak, M. Brzychczy-Włoch, E. Pamuła, A. Kotarba, W. Simka, Hybrid oxide-polymer layer formed on Ti-15Mo alloy surface enhancing antibacterial and osseointegration functions, *Surf. Coat. Technol.* 302 (2016) 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.05.073>
- [244] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero, Synthesis of Biodegradable Copolymers with the Use of Low Toxic Zirconium Compounds. 1. Copolymerization of Glycolide with L-Lactide Initiated by Zr(Acac)₄, *Macromol.* 34 (2001) 5090-5098. <https://doi.org/10.1021/ma0018143>

-
- [245] J. Kasperczyk, Microstructural analysis of poly[(L,L-lactide)-co-glycolide] by ¹H and ¹³C n.m.r. spectroscopy, *Polym.* 37:2 (1996) 201-203. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(96\)81088-3](https://doi.org/10.1016/0032-3861(96)81088-3)
- [246] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero, Synthesis of Biodegradable Copolymers with the Use of Low Toxic Zirconium Compounds. 1. Copolymerization of Glycolide with L-Lactide Initiated by Zr(Acac)₄, *Macromol.* 34 (2001) 5090-5098. <https://doi.org/10.1021/ma0018143>
- [247] P. Dobrzyński, Mechanism of ε-caprolactone polymerization and ε-caprolactone/trimethylene carbonate copolymerization carried out with Zr(Acac)₄, *Polymer* 48 (2007) 2263-2279. doi:10.1016/j.polymer.2007.02.005
- [248] M. Pastusiak, P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, M. Sobota, B. Kaczmarczyk, H. Janeczek, Synthesis of trimethylene carbonate/ε-caprolactone copolymers initiated with zinc alkoxide: influence of copolymer chain microstructure on thermal and mechanical properties, *Polym. Int.* 66 (2017) 1259-1268. DOI 10.1002/pi.5379
- [249] Strona internetowa producenta Advansource Biomaterials, ChronoSil®, 2023, <http://www.advbiomaterials.com/products/polycarbonate/chronosil.html>, Dostęp: 18.04.2023
- [250] Strona internetowa producenta Advansource Biomaterials, HydroThane™, 2023, <http://www.advbiomaterials.com/products/hydrophilic/hydrothane.html>, Dostęp: 18.04.2023
- [251] Strona internetowa producenta Advansource Biomaterials, ChronoFlex®, 2023, http://www.advbiomaterials.com/products/polycarbonate/chronoflex_al.html, Dostęp: 18.04.2023
- [252] A. Haeri, M. Osouli, F. Bayat, S. Alavi, S. Dadashzadeh, Nanomedicine approaches for sirolimus delivery: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies, *Artificial Cells Nanomed. Biotechnol.* 46 (2018) 1-14. DOI: 10.1080/21691401.2017.1408123
- [253] A. Amanullah, A. Upadhyay, R. Dhiman, S. Singh, A. Kumar, D.K. Ahirwar, R.K. Gutti, A. Mishra, Development and Challenges of Diclofenac-Based Novel Therapeutics: Targeting Cancer and Complex Diseases, *Cancers* 14:4385 (2022) 1-19. <https://doi.org/10.3390/cancers14184385>
- [254] E. Ewaldz, B. Brettmann, Molecular Interactions in Electrospinning: From Polymer Mixtures to Supramolecular Assemblies, *ACS Appl. Polym. Mater.* 1 (2019) 298–308. <https://doi.org/10.1021/acsapm.8b00073>
- [255] B. Yalcinkaya, F. Yener, O. Jirsak, F. Cengiz-Callioglu, On the Nature of Electric Current in the Electrospinning Process, *J. Nanomater.* 538179 (2013) 1-10. <https://doi.org/10.1155/2013/538179>
- [256] F. Topuz, M.A. Abdulhamid, T. Holtzl, G. Szekely, Nanofiber engineering of microporous polyimides through electrospinning: Influence of electrospinning parameters and salt addition, *Mater. Des.* 198:109280 (2021) 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109280>.
- [257] A.A. Saei, F. Jabbaribar, M.A.A. Fakhree, W.E. Acree, A. Jouyban, Solubility of sodium diclofenac in binary water + alcohol solvent mixtures at 25°C, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 18:2 (2008) 149–151. doi:10.1016/s1773-2247(08)50024-4
- [258] P.J. Gandhi, Z.V.P. Murthy, Solubility and Crystal Size of Sirolimus in Different Organic Solvents, *J. Chem. Eng. Data* 55:11 (2010) 5050–5054. doi:10.1021/je100626x
- [259] Z. Wang, X. Chen, J. Zeng, F. Liang, P. Wu, H. Wang, Controllable deposition distance of aligned pattern via dual-nozzle near-field electrospinning, *AIP Adv.* 7:035310 (2017) 1-9. <https://doi.org/10.1063/1.4974936>
- [260] A. Gupta, P. Ayithapu, R. Singhal, Study of the electric field distribution of various electrospinning geometries and its effect on the resultant nanofibers using finite element simulation, *Chem. Eng. Sci.* 23:116463 (2021) 1-17. doi:10.1016/j.ces.2021.116463
- [261] Y. Kikkawa, T. Suzuki, M. Kanosato, Y. Doi, H. Abe, Effect of Phase Structure on Enzymatic Degradation in Poly(l-lactide)/Atactic Poly(3-hydroxybutyrate) Blends with Different Miscibility, *Biomacromol.* 10:4 (2009) 1013–1018. <https://doi.org/10.1021/bm900117j>

-
- [262] T.G. Fox, Influence of diluent and of copolymer composition on the glass temperature of a polymer system, *Bull. Am. Phys. Soc.* 1 (1956) 123.
- [263] M.S. Tacchi Campos, S.L. Fialho, B.G. Pereira, M.I. Yoshida, A.S. Cunka Junior, M.A. Oliveira, Development and chemical characterization of biodegradable polymeric implants containing sirolimus for the treatment of malignant solid tumors, *Pharmazie* 74:4 (2019) 221-226. <https://doi.org/10.1691/ph.2019.8201>
- [264] C.V. Rocha, V. Gonçalves, M. Costa da Silva, M. Bañobre-López, J. Gallo, PLGA-Based Composites for Various Biomedical Applications, *Int. J. Mol. Sci.* 23:2034 (2022) 1-33. <https://doi.org/10.3390/ijms23042034>
- [265] M.R. Sowmya, P. Ajitha, S. Pradeep, Evaluation of Cytotoxicity of Diclofenac Sodium on L929 Fibroblasts - An in vitro Study, *J. Phram. Res. Int.* 32:18 (2020) 171-177. <https://DOI:10.9734/jpri/2020/v32i1830700>
- [266] S. Cai, Ch. Wu, W. Yang, W. Liang, H. Yu, L. Liu, Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviours, *Nanotechnol. Rev.* 9:1 (2020) 971-989. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2020-0076>
- [267] A. Frank, S.K. Rath, S.S. Venkatraman, Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition, *J. Control. Release* 102:2 (2005) 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.019>.
- [268] J. Wang, M. Windbergs, Influence of polymer composition and drug loading procedure on dual drug release from PLGA:PEG electrospun fibers, *Eur. J. Pharm. Sci.* 124 (2018) 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.028>.
- [269] S.F. Chou, K.A. Woodrow, Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 65 (2017) 724-733. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.09.004>.
- [270] M.W. Frey, Ch. Xiang, M.P. Hoffmann, A.G. Taylor, J. Gardner, Biodegradable Chemical Delivery System, US Patent Application Publication, US2011275520 A1 (2011).
- [271] V.P. Shastri, J.C. Sy, Modulation of Drug Release Rate From Electrospun Fibers, US Patent Application Publication, US2012058100 A1 (2012).
- [272] S.M. Kamath, K. Sridhar, D. Jaison, V. Gopinath, B.K. Mohamed Ibrahim, N. Gupta, A. Sundaram, P. Sivaperumal, S. Padmapriya, S. Shantanu Patil, Fabrication of tri-layered electrospun polycaprolactone mats with improved sustained drug release profile, *Sci. Rep.* 10:18179 (2020) 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74885-1>
- [273] I. Srdanovic, Factors Influencing 1st and 2nd Generation Drug-Eluting Stent Performance: Understanding the Basic Pharmaceutical Drug-in-Polymer Formulation Factors Contributing to Stent Thrombosis Do We Really Need to Eliminate the Polymer? *J. Pharm. Pharm. Sci.* 24 (2021) 435-461. <https://doi.org/10.18433/jpps32053>