

INSTYTUT BIOCYBERNETYKI I INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ

im. Macieja Nałęcza

POLSKA AKADEMIA NAUK

Rozprawa doktorska

Systemy uwalniania leków oparte na nanowłóknach

mgr inż. Paweł Nakielski

Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN

Promotor: Prof. dr hab. Tomasz A. Kowalewski, IPPT PAN

Promotor pomocniczy: dr inż. Tomasz Kowalczyk, IPPT PAN

WARSZAWA 2014

Niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana dzięki wsparciu stypendialnemu ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Kapitał Ludzki w ramach realizacji projektu „Wsparcie przedsiębiorczości naukowców bio-tech-med poprzez stypendia, staże i szkolenia” (UDA POKL.08.02.01-14-041/09). Duża część kosztów przeprowadzonych badań mogła zostać pokryta dzięki ich finansowaniu z projektu NCBiR #13008110.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Bio & Technology
Innovations Platform

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Składam serdeczne podziękowania

Panu Prof. Tomaszowi Kowalewskiemu
za opiekę oraz liczne rozmowy będące inspiracją w kierunku nowych rozwiązań
i motywacją do jeszcze cięższej pracy.

Panu Dr. Tomaszowi Kowalczykowi
za wprowadzenie mnie w temat elektroprzędnienia, cenne uwagi i wszelką pomoc
jakiej mi udzielił w czasie naszej współpracy.

Serdecznie dziękuję za współpracę w realizacji badań Pani Prof. Małgorzacie Frontczak-
Baniewicz i Dr. Dorocie Sulejczak z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.

Dziękuję także

Panu Dr. Sławomirowi Błońskiemu i Krzysztofowi Zembrzyckiemu
za okazaną pomoc w realizacji badań eksperymentalnych.

Panu Dr. Tomaszowi Zielińskiemu
za konsultacje i pomoc w zakresie modelowania numerycznego programem
COMSOL.

Wszystkim koleżankom i kolegom z Instytutu oraz wszystkim tym którzy
przyczynili się do powstania niniejszej pracy.

Szczególne słowa podziękowania składam mojej żonie Magdalenie za cierpliwość,
wrozumiałość i olbrzymie wsparcie.

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

Streszczenie

Systemy uwalniania leków oparte na nanowłóknach, Paweł Nakielski, IPPT PAN

W pracy podjęto się zadania stworzenia systemu uwalniania leków opartego na zastosowaniu biodegradowalnych materiałów polimerowych wytworzonych z nanowłókien otrzymywanych metodą elektroprzędzenia. Bezpośrednim celem tej pracy było stworzenie aktywnego opatrunku wspomagającego operacje neurochirurgiczne.

Praca zawiera doświadczalną i numeryczną analizę procesu uwalniania i transportu leku do typowego płynu buforowego oraz symulanta tkanki mającą na celu znalezienie optymalnych warunków kontrolowania w czasie i przestrzeni rozkładu stężenia leku. Uwalnianie leku w zaproponowanym modelu matematycznym opisano za pomocą równań adsorpcji-desorpcji, zaś transport w porowatym materiale z wykorzystaniem równania dyfuzji. Przedstawiona analiza parametrów materiałów z nanowłókien mających wpływ na szybkość uwalniania leków, opis matematyczny procesu lokalnego uwalniania leków z materiałów polimerowych, jak również transportu substancji aktywnych w organizmie w szczególności w tkance mózgowej, pozwoliły na zbudowanie modelu numerycznego umożliwiającego parametryczną ocenę wpływu czynników geometrycznych, struktury materiału, metody enkapsulacji leku we włóknach, jak i własności nanowłókien na profile uwalniania leków.

W celu kalibracji i walidacji modelu numerycznego zaproponowano układ eksperymentalny do oceny procesu transportu analogów leków (Rodamina B i białko BSA) z materiału umieszczonego w środowisku symulującym tkankę.

W rezultacie przeprowadzonych badań stworzono materiały do operacji chirurgicznych oparte na trzech lekach neuroprotektycznych: lipofilowego alfa-tokoferolu, oraz hydrofilowych czynników wzrostu NGF (Nerve Growth Factor) i BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor). Jako nośników leków użyto biodegradowalnych i biokompatybilnych polimerów poli(L-laktydu-co-kaprolaktonu) PLC, poli(L-laktydu) PLLA, poli(DL-laktydu-co-glikolidu) PDLG.

Przeprowadzone we współpracy z Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN operacje neurochirurgiczne wykonane na modelu zwierzęcym potwierdziły pozytywny wpływ wytworzonych z nanowłókien materiałów na proces regeneracji tkanki nerwowej, zapobiegając jednocześnie szkodliwemu dla tego procesu bliznowaceniu tkanki.

Abstract

Drug delivery systems based on nanofibers, Paweł Nakielski, IPPT PAN

In this work the task of preparation of drug release system based on the biodegradable polymeric materials made from nanofibers obtained by electrospinning is presented. The main goal of this work was to create an active dressing for the use in neurosurgery.

The work includes experimental and numerical analysis of the release process and transport of the drug to the typical buffer fluid and tissue simulator aimed at finding the optimal conditions to control in time and space the drug concentration distribution. The drug release in proposed mathematical model was described by the adsorption-desorption equation while transport in the porous material by the diffusion equation. Presented analysis of nanofibrous material parameters affecting drug release rate, the mathematical description of the process of local drug release from polymeric materials as well as the transport of active substances in the body, in particular in brain tissue, enabled the construction of a numerical model allowing a parametric evaluation of geometric factors, structure of the material, the drug encapsulation in the fibers, as well as the properties of nanofibers on the drug release profiles.

In order to calibrate and validate the numerical model, the experimental system have been proposed to assess transport of the drug analog (rhodamine B and the protein BSA) from the material located in a tissue simulating medium.

As a result materials for surgical operations based on three neuroprotective drugs: lipophilic alpha-tocopherol and hydrophilic growth factors NGF (Nerve Growth Factor) and BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) were developed. As a drug carriers biocompatible biodegradable polymers poly(L-lactide-*co*-caprolactone) PLC, poly(L-lactide) PLLA, poly(DL-lactide-*co*-glycolide) PDLG were used.

Conducted in collaboration with the Mossakowski Medical Research Centre PAS neurosurgeries performed on an animal model confirmed positive impact of nanofibrous materials on the process of regeneration of nerve tissue, preventing at the same time improper process of tissue scarring.

Cel i zakres pracy

Celem niniejszej pracy jest:

- identyfikacja kluczowych parametrów procesowych oraz materiałowych mających wpływ na proces uwalniania leków z nanowłókien polimerowych,
- zbudowanie modelu numerycznego służącego do optymalizacji elektroprzędzonych materiałów,
- zbudowanie układu eksperymentalnego służącego do oceny uwalniania wytworzonych materiałów,
- zbadanie wpływu zidentyfikowanych parametrów na proces uwalniania leków i wybór materiałów do badań nieklinicznych,
- zbudowanie opatrunku aktywnego do użycia w operacjach neurologicznych i pozwalającego na kontrolowane, wielodniowe uwalnianie leków.

Zakres pracy obejmuje:

- przegląd literatury dotyczącej uwalniania leków, ze szczególnym uwzględnieniem uwalniania z nanowłókien oraz modeli matematycznych opisujących proces transportu leku z nośników polimerowych,
- doświadczalne zbadanie uwalniania leków hydrofilowych oraz lipofilowych typową techniką stosowaną w literaturze oraz w autorskim układzie eksperymentalnym pozwalającym na czasoprzestrzenną analizę ilościową procesu uwalniania analogów leków,
- analizę numeryczną transportu leków z materiałów polimerowych,
- opracowanie wyników uzyskanych badań i porównanie z zaproponowanymi modelami matematycznym,
- zaprezentowanie aplikacyjnego wykorzystania otrzymanych nanomateriałów.

Tezy pracy

1. Materiały z nanowłókien dzięki swojej strukturze i biokompatybilnemu składowi pozwalają na stworzenie opatrunku do użycia w operacjach neurologicznych, sprzyjającego regeneracji tkanki mózgowej i pozwalającego na kontrolowane, wielodniowe uwalnianie leków.
2. Analiza eksperymentalna w warunkach laboratoryjnych i modelowanie numeryczne pozwala opracować optymalną strukturę i geometrię materiału z nanowłókien, tak by proces uwalniania leku przebiegał zgodnie z procedurą medyczną.

Spis treści

Streszczenie.....	i
Abstract	iii
Cel i zakres pracy	iii
Tezy pracy	vii
Spis treści	ix
Spis symboli	xiii
Spis rysunków i tabel	xvi
1. Wprowadzenie.....	1
1.1. Systemy uwalniania leków	1
1.2. Nanowłókna	7
1.2.1. Aparatura.....	8
1.2.2. Prowadzenie procesu.....	10
1.2.3. Parametry materiałowe i procesowe wpływające na morfologię nanowłókien	10
1.3. Metody wprowadzania leków do nanowłókien	12
1.3.1. Nanowłókna z homogenicznie rozmieszczonym lekiem	13
1.3.2. Nanowłókna typu rdzeń – osnowa	15
1.3.3. Nanowłókna z elektroprzędzonej emulsji	17
1.4. Charakterystyczne parametry materiałów z nanowłókien wpływające na szybkość uwalniania leków.....	19
1.4.1. Skład nanowłókien	19
1.4.2. Rozmiar nanowłókien	21
1.4.3. Porowatość materiału i nanoporowatość włókien.....	24
1.4.4. Hydrofobowość – hydrofilowość materiału.....	26
1.4.5. Ukierunkowanie nanowłókien	27
1.5. Modele uwalniania leków	28
1.5.1. Modele empiryczne i pół-empiryczne.....	30
1.5.2. Modele mechanistyczne	32
1.5.3. Modele numeryczne	38

1.6.	Los leku w ustroju.....	39
1.7.	Podawanie leków do mózgu	41
1.7.1.	Uszkodzenie mózgu	44
1.7.2.	Transport leku w mózgu	45
2.	Materiały i metody	47
2.1.	Polimery i rozpuszczalniki.....	47
2.2.	Formowanie nanowłókien	47
2.3.	Zastosowane leki i ich analogi	48
2.3.1.	Leki lipofilowe	48
2.3.2.	Leki hydrofilowe.....	49
2.4.	Metody wprowadzania leków do materiału	49
2.4.1.	Uwięzienie leków w nanowłóknach	49
2.4.1.1.	Włókna homogeniczne (monolityczne)	49
2.4.1.2.	Włókna elektroprzędzone z emulsji.....	50
2.4.1.3.	Struktura włókien typu rdzeń w osnowie.....	50
2.4.2.	Przestrzenne metody uwięzienia leków	51
2.5.	Środowisko uwalniania leków (krzywe wzorcowe i profile uwalniania)	51
2.5.1.	Leki lipofilowe	52
2.5.2.	Leki hydrofilowe.....	54
2.6.	Metody obrazowania nanowłókien	56
2.6.1.	Mikroskopia optyczna i fluorescencyjna	56
2.6.2.	Mikroskopia konfokalna	56
2.6.3.	Mikroskopia elektronowa	56
2.6.3.1.	Pomiar rozkładu grubości włókien	56
2.6.3.2.	Pomiar ukierunkowania włókien.....	57
2.7.	Metoda pomiaru kąta zwilżania materiałów	57
2.8.	Metoda pomiaru napięcia powierzchniowego	58
2.9.	Metoda pomiaru porowatości nanowłókien	59
2.10.	Wyznaczanie współczynnika dyfuzji w hydrożelu PVA metodą FRAP	59
2.11.	Układ eksperymentalny do oceny materiałów	61
3.	Analiza numeryczna	65
3.1.	Model numeryczny i program obliczeniowy	65
3.2.	Dyfuzja w materiałach porowatych	69

3.3. Modelowanie uwalniania leków z nanowłókien.....	71
3.3.1. Główne założenia modelu numerycznego.....	73
3.3.2. Model mikroskopowy – podstawowy	75
3.3.2.1. Założenia podstawowego modelu mikroskopowego.....	77
3.3.2.2. Warunki brzegowe i początkowe.....	77
3.3.2.3. Analiza bezwymiarowa	79
3.3.2.4. Rozwiązanie modelu matematycznego.....	80
3.3.3. Model mikroskopowy – rozszerzony	83
3.3.3.1. Założenia rozszerzonego modelu mikroskopowego.....	83
3.3.3.2. Warunki brzegowe i początkowe.....	85
3.3.3.3. Analiza bezwymiarowa	85
3.3.3.4. Rozwiązanie modelu matematycznego.....	87
3.3.4. Makroskopowy, dwuwymiarowy model uwalniania leku z materiału do hydrożelu	90
3.3.4.1. Założenia podstawowego modelu makroskopowego	90
3.3.4.2. Warunki brzegowe i początkowe.....	92
3.3.4.3. Analiza bezwymiarowa	93
3.3.4.4. Rozwiązanie modelu matematycznego.....	94
3.3.5. Rozszerzony, dwuwymiarowy model uwalniania leków z materiałów do hydrożelu	96
3.3.5.1. Założenia rozszerzonego modelu makroskopowego	97
3.3.5.2. Warunki brzegowe i początkowe.....	99
3.3.5.3. Analiza bezwymiarowa	101
3.3.5.4. Rozwiązanie modelu matematycznego.....	103
3.4. Podsumowanie	106
4. Wyniki badań i dyskusja	107
4.1. Uwalnianie leków do roztworów wodnych	107
4.1.1. Badanie uwalniania leków lipofilowych.....	108
4.1.1.1. Analog leku – Rodamina B	108
4.1.1.2. Lek – alfa-tokoferol.....	121
4.1.2. Badania nad uwalnianiem leków hydrofilowych.....	126
4.1.2.1. Analog leku – BSA-FITC	126
4.1.2.2. Leki – czynniki wzrostu NGF i BDNF	135

4.2.	Uwalnianie leków do hydrożelu PVA	144
4.3.	Analiza parametryczna modeli numerycznych	159
4.3.1.	Model dwuwymiarowy (rozszerzony bez pulsacji płynu mózgowo – rdzeniowego	159
4.3.2.	Model dwuwymiarowy (rozszerzony bez pulsacji płynu mózgowo – rdzeniowego	162
4.3.3.	Model trójwymiarowy (podstawowy)	163
5.	Zastosowanie elektroprzędzonych nanowłókien jako opatrunków uszkodzonej tkanki nerwowej	177
6.	Podsumowanie wyników badań	185
7.	Bibliografia	187
8.	Publikacje	197
8.1.	Experimental and numerical evaluation of drug release from nanofibers mats to brain tissue, J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater	197
8.2.	Electrosun nanofibers mat as a protector against the consequences of brain injury, Folia Neuropathol	207
8.3.	Symulacje numeryczne procesu desorpcji I dyfuzji leku w materiale z nanowłókien, Modelowanie Inż	221

Spis ważniejszych symboli

a	–	powierzchnia właściwa włókien (m^2/m^3)
f	–	częstotliwość pulsacji płynu związana z częstością akcji serca (bpm –uderzenia na minutę) lub skorygowany ułamek objętościowy (1/min)
h	–	odległość pomiędzy dyszą a kolektorem (cm)
k	–	współczynnik uwalniania (m/s) lub przepuszczalność hydrauliczna materiału (m^2)
k_a	–	współczynnik adsorpcji ($m^3/kg \cdot s$)
k_c	–	współczynnik transportu masy (m/s)
k_c^{out}	–	współczynnik transportu masy do płynu otaczającego materiał (m/s)
k_d	–	współczynnik desorpcji (1/s)
k_e	–	współczynnik reakcji eliminacji (1/s)
k_h	–	stała Henry'ego (Pa)
p_0	–	ciśnienie atmosferyczne (Pa)
r_s	–	promień dyfundującej cząstki (nm)
\vec{u}	–	wektor prędkości płynu (m/s)
u_{max}	–	prędkość maksymalna przepływu płynu mózgowo -rdzeniowego (m/s)
x,y,z	–	współrzędne w kartezjańskim układzie współrzędnych (m)
A_t	–	powierzchnia kontaktu materiału ze skórą (m^2)
BDNF	–	neotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (Brain Derived Neurotrophic Factor)
BMP2	–	czynnik morfogenetyczny kości (Bone Morphogenic Protein 2)
BSA	–	białko surowicy wołowej (Bovine Serum Albumin)
C_0	–	stężenie początkowe leku w materiale przeliczone na masę polimeru (kg/kg)
C_A	–	stężenie leku w materiale polimerowym (kg/kg)
C_A^{max}	–	maksymalne stężenie leku w materiale polimerowym (kg/kg)
C_B	–	stężenie masowe leku w płynie otaczającym włókna (kg/m^3)
C_{Bf}^{out}	–	stężenie masowe leku w płynie poza domeną obliczeniową (kg/m^3)
C_B^{pow}	–	stężenie masowe leku w płynie na powierzchni rozdzielającej domeny obliczeniowe (kg/m^3)
C_C	–	stężenie masowe leku w płynie (kg/m^3)
CEDD	–	Convention Enhanced Drug Delivery
C_s	–	stężenie nasycenia (kg/m^3)
D	–	współczynnik dyfuzji (m^2/s)
Da	–	liczba kryterialna Damköhlera (-)
DCM	–	dichlorometan
DMF	–	N,N–dimetyloformamid
DMOG	–	dimetylooksoallilloglicyna
EEP	–	fosforan trietylu (ethyl ethylene phosphate)

FDA	–	Food and Drug Administration, Amerykańska Administracja Żywności i Leków
FRAP	–	Fluorescence Recovery After Photobleaching
HFIP	–	1,1,1,3,3,3-hexafluoroizopropanol
I_{norm}	–	znormalizowana intensywność fluorescencji (-)
L	–	grubość materiału lub grubość włókna (m)
M_0	–	masa substancji zawarta w materiale w chwili początkowej (kg)
M_t	–	masa substancji uwolniona po czasie t (kg)
M_∞	–	masa leku uwolniona z materiału po nieskończone długim czasie (kg)
NGF	–	czynnik wzrostu nerwów (Nerve Growth Factor)
PAN	–	poli(akrylo nitryl)
PBS	–	bufor fosforanowy (Phosphate Buffered Saline)
PC12	–	linia komórkowa wyprowadzona z guza chromochłonnego nadnercza szczura
PCL	–	poli(ϵ -kaprolakton)
PDLG	–	poli(DL-laktyd- <i>co</i> -kwas glikolowy)
PDLLA	–	poli(DL-laktyd)
Pe	–	liczba kryterialna Pecleta (-)
PEG	–	poli(tlenek etylenu)
PEI	–	poli(etylenoimina)
PEO	–	poli(tlenek etylenu)
PHB	–	poli(hydroksymaślan)
PLC	–	poli(laktyd- <i>co</i> -kaprolakton)
PLGA	–	poli(laktyd- <i>co</i> -kwas glikolowy)
PLLA	–	poli(L-laktyd)
PMMA	–	poli(metakrylan metylenu)
PPO	–	poli(tlenek fenylenu)
PU	–	poliuretan
PVA	–	poli(alkohol winylowy)
PVB	–	poli(winylobutyral)
Q	–	natężenie objętościowe przepływu roztworu polimeru ($\mu\text{l/h}$)
R	–	stała gazowa ($\text{J/mol}\cdot\text{K}$)
SBI	–	chirurgiczne uszkodzenie mózgu (Surgical Brain Injury)
SDS	–	laurylosiarczan sodu (sodium dodecyl sulfate)
SEM	–	mikroskop skaningowy (Scanning Electron Microscope)
Sh	–	liczba kryterialna Sherwooda (-)
T	–	temperatura bezwzględna (K)
TAIC	–	izocyjanuran triallilowy (triaryl isocyanurate)
TBI	–	urazowe uszkodzenie mózgu (Traumatic Brain Injury)
TFE	–	2,2,2-trifluoroetanol
V	–	napięcie zasilania (kV)
VEGF	–	czynnik wzrostu naczyń krwionośnych (Vascular Endothelial Growth Factor)

Symbole greckie

δ	–	wysokość przestrzeni podpajęczynówkowej (m)
ε	–	porowatość materiału z nanowłókien definiowana jako stosunek objętości porów do objętości materiału (-)
∇p	–	spadek ciśnienia (Pa)
μ	–	dynamiczny współczynnik lepkości płynu (Pa·s)
λ	–	długość fali światła (nm)
ρ	–	gęstość płynu mózgowo-rdzeniowego (kg/m ³)
ρ_p	–	gęstość właściwa matrycy polimerowej (kg/m ³)
σ	–	napięcie powierzchniowe (mN/m)
Ω	–	oznaczenie domeny obliczeniowej
Γ	–	oznaczenie brzegu domeny obliczeniowej
Θ	–	kąt zwilżania (°)

Spis rysunków i tabel

	str.	
Rys. 1.1.	Wykres przedstawiający przebieg stężenia leku w ustroju w czasie po podaniu leku: a) dożylnie, b) doustnie w postaci tabletek.	3
Rys. 1.2.	a) Przykładowy profil kontrolowanego uwalniania leku. Chwilowa szybkość uwalniania jest równa tangensowi kąta nachylenia stycznej w danym punkcie. b) Zakładany przebieg stężenia leku w ustroju w czasie po podaniu leku z systemu kontrolowanego uwalniania.	4
Rys. 1.3.	Schemat układu do elektroprzędzenia nanowłókien [36].	9
Rys. 1.4.	Zdjęcie stanowiska do produkcji nanowłókien w warunkach kontrolowanej atmosfery. IPPT PAN	9
Rys. 1.5.	a) Proces powstawania nanowłókien. Widoczna kropla pod dyszą tworzy stożek Taylora, z którego uwalnia się prostoliniowy odcinek strugi polimeru. Dalej widoczny jest obszar wirowania i rozciągania strugi. Czas ekspozycji zdjęcia 12,5 ms. b) Kształt rozciąganej kropli bardzo lepkiej cieczy [38].	11
Rys. 1.6.	Porównanie modeli doświadczalnych o kinetyce zerowego a) i pierwszego rzędu b) oraz modelu Peppasa c). W obliczeniach założono jednakową stałą szybkości uwalniania wynoszącą $k = 1 \cdot 10^{-2}$ dla każdego z modeli. Obliczenia własne.	32
Rys. 1.7.	Rysunek komórki nerwowej Purkiniego i komórek ziarnistych z mózdzku gołębia, przedstawiony przez Santiago Ramón y Cajal 1899r. Instytut Cajal, Madryt, Hiszpania.	43
Rys. 2.1.	Schemat elektroprzędzenia typu rdzeń w osnowie.	51
Rys. 2.2.	Krzywa wzorcowa a) alfa-tokoferolu i b) Rodaminy B.	53
Rys. 2.3.	Krzywa wzorcowa a) NGF i b) BDNF.	55
Rys. 2.4.	Krzywa wzorcowa a) BSA i b) BSA-FITC.	55
Rys. 2.5.	Kolejne etapy pomiaru ukierunkowania nanowłókien: a) obraz nanowłókien SEM, b) graficzny wynik działania algorytmu do określania kierunku włókien wraz z legendą c) oznaczenia kolorów odpowiadające odpowiedniemu kierunkowi, d) histogram przedstawiający dominujące kierunki ułożenia nanowłókien.	57
Rys. 2.6.	Kąt zwilżania materiałów z nanowłókien PLC. Hydrofilowy materiał a) elektroprzędzony z emulsji oraz hydrofobowy materiał b) z monolitycznych nanowłókien.	58
Rys. 2.7.	Kształt kropli roztworu polimeru PLC w otoczeniu wody.	59
Rys. 2.8.	Poszczególne etapy eksperymentu FRAP: a) wybranie obszaru do wyświecenia i wyznaczenie intensywności fluorescencji, b) fluorescencja w ROI po wyświeceniu, c) powrót fluorescencji związany z dyfuzją cząsteczek do wyświeconego obszaru, d) przebieg intensywności fluorescencji w obszarze ROI w czasie.	60
Rys. 2.9.	a) Układ eksperymentalny do oceny elektroprzędzonych materiałów. b) Kontury stężenia Rodaminy B otrzymane podczas eksperymentu. Punkt P to obszar 3 x 3 piksele w którym obliczano średnią wartość stężenia dla poszczególnych czasów eksperymentu. Wartości stężenia posłużyły do znalezienia parametrów kinetycznych modelu numerycznego c) Kontury stężenia uzyskane po dopasowaniu współczynników w modelu numerycznym.	63
Rys. 2.10.	Krzywa wzorcowa Rodaminy B i BSA-FITC w hydrożelu PVA.	64
Rys. 2.11.	Stężenie Rodaminy B (szare trójkąty) w punkcie P1 oraz zmierzona wartość napięcia na fotodiodzie (gruba czarna linia). Szara pozioma linia to średnia wartość napięcia na fotodiodzie. Linia czerwona przedstawia skorygowaną wartość stężenia Rodaminy B po uwzględnieniu zmian natężenia lasera.	64

Rys. 3.1.	a) Zależność współczynnika dyfuzji w materiale w funkcji wzajemnego stosunku rozmiarów cząsteczki leku i włókna dla różnych porowatości materiału porowatości obliczona na podstawie równania 3.22. b) Zależność współczynnika dyfuzji w materiale w funkcji jego porowatości obliczona na podstawie równania (3.22) dla podanych parametrów: $a = \pi$, $b = 2,002$, $r_s = 0,9$ nm, $r = 1,5$ μ m, $\lambda = 0,0003$.	71
Rys. 3.2.	Mechanizm uwalniania leku z nanowłókien. Na rysunku wyodrębniono pojedynczy nanopor we włóknie w którym zachodzi proces desorpcji i dyfuzji.	72
Rys. 3.3.	a) Geometria komórki elementarnej z regularnie ułożonymi włóknami. Powiększenie przedstawiające powierzchnię nanowłókien - Γ , z której uwalniany jest lek. Czarnymi strzałkami zaznaczono ścianki domeny z warunkiem brzegowym kontaktu z płynem odbierającym substancję aktywną. Na pozostałych czterech zewnętrznych ściankach domeny zastosowano warunek brzegowy symetrii. b) Objętość porów między włóknami komórki elementarnej - Ω . c) Widok z góry komórki elementarnej przedstawiający geometrię po wycięciu włókien z domeny obliczeniowej.	76
Rys. 3.4.	a) Wpływ liczby Damköhlera na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Sh = 1 \cdot 10^{-4}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$. b) Wpływ liczby Sherwooda na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 5 \cdot 10^{-7}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $K = 1$.	81
Rys. 3.5.	a) Wpływ równowagi sorpcji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 5 \cdot 10^{-7}$, $Sh = 1 \cdot 10^{-4}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$. b) Wpływ stężenia początkowego na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 5 \cdot 10^{-7}$, $Sh = 1 \cdot 10^{-4}$, $K = 1$.	82
Rys. 3.6.	Komórka elementarna składająca się z dwóch domen: a) włókien Ω_1 i b) przestrzeni między włóknami Ω_2 .	84
Rys. 3.7.	a) Wpływ liczby Damköhlera na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-3}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$. b) Wpływ oporu przenikania składnika z włókna do otaczającego płynu na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$.	87
Rys. 3.8.	a) Wpływ ilorazu współczynników dyfuzji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-4}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$. b) Wpływ równowagi sorpcji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-4}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$.	88
Rys. 3.9.	a) Wpływ porowatości na szybkość uwalniania składnika z materiału przy zwiększonych oporach przenikania składnika z włókna do otaczającego płynu. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$. b) Wpływ stężenia początkowego na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-4}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$.	89
Rys. 3.10.	Schemat przedstawiający miejsce zastosowania opatrunku i efekt jego działania w postaci wzrostu stężenia leku w mózgu. Przerywana żółta linia to oś symetrii w uproszczonym układzie biorącym pod uwagę dyfuzję leku we fragmencie tkanki mózgowej (Rys. 3.11).	90
Rys. 3.11.	Dwuwymiarowa domena obliczeniowa przedstawiająca modelowany materiał (Ω_1) oraz subdomena hydrożelu imitującego tkankę nerwową (Ω_2). Wymiary modelowanego materiału wynoszą: promień $r = 2,5 \cdot 10^{-3}$ m oraz grubość $d = 100 \cdot 10^{-6}$ m. Wymiar domeny Ω_2 : wysokość $3 \cdot 10^{-2}$ m, szerokość $3 \cdot 10^{-2}$ m.	91

- Rys. 3.12. a) Wpływ liczby Damköhlera na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$. b) Wpływ oporu przenikania składnika z materiału do hydrożelu na szybkość uwalniania składnika. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$ 94
- Rys. 3.13. a) Wpływ ilorazu współczynników dyfuzji na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$ b) Wpływ równowagi sorpcji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D = 10$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$. 95
- Rys. 3.14. a) Wpływ porowatości na szybkość uwalniania składnika z materiału przy zwiększonych oporach przenikania składnika z włókna do otaczającego płynu. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-6}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$ b) Wpływ stężenia początkowego na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 5 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D = 10$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$. 96
- Rys. 3.15. Rys. 3.15. Dwuwymiarowa domena obliczeniowa przedstawiająca modelowany materiał (Ω_1), subdomenę hydrożelu imitującego tkankę nerwową (Ω_2) oraz subdomenę reprezentującą przestrzeń podpajęczynówkową, którą płynie płyn mózgowo – rdzeniowy (Ω_3). Wymiary modelowanego materiału wynoszą $r = 2,5 \cdot 10^{-3}$ m oraz grubość $d = 100 \cdot 10^{-6}$ m. Wymiar domeny Ω_2 : wysokość $3 \cdot 10^{-2}$ m, szerokość $3 \cdot 10^{-2}$ m. 99
- Rys. 3.16. a) Wpływ liczby Damköhlera na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-1}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$. b) Wpływ oporu przenikania składnika z materiału do hydrożelu na szybkość uwalniania składnika. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-1}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$. 103
- Rys. 3.17. a) Wpływ równowagi sorpcji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-7}$, $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-1}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-4}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$. b) Wpływ ilorazu współczynników dyfuzji na szybkość uwalniania składnika z materiału. W tym przypadku zaobserwowano podobny przebieg profili uwalniania substancji pod wpływem zmiany D_1 u D_2 . Z tego powodu przedstawiono wyłącznie jeden wykres uwalniania. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_2 = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$. 104
- Rys. 3.18. a) Wpływ porowatości na szybkość uwalniania składnika z materiału przy zwiększonych oporach przenikania składnika z włókna do otaczającego płynu. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-1}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$ b) Wpływ stężenia początkowego na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-1}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $K = 1$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $Pe = 5 \cdot 10^3$. 105
- Rys. 3.19. Wpływ liczby Peclet na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-6}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$. 106
- Rys. 4.1. Fragment materiału wytworzonego metodą elektroprzędzenia. Materiał elektroprzędzono z roztworu PLC z Rodaminą B. 108
- Rys. 4.2. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLLA (MR1). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny. 111

Rys. 4.3.	Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MR2). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.	111
Rys. 4.4.	Obraz mikroskopii SEM powierzchni ukierunkowanych nanowłókien polimeru PDLG (MR3).	112
Rys. 4.5.	Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MR4). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.	112
Rys. 4.6.	Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MR5). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.	112
Rys. 4.7.	Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien typu rdzeń w osnowie (MR6). Materiał wykonano z polimeru PLC. Widoczne znacznie cieńsze włókna powstałe podczas wtórnego elektroprzędzenia ze strugi polimeru.	112
Rys. 4.8.	Obraz mikroskopii SEM przekroju nanowłókien typu rdzeń w osnowie (MR6). Zmierzona grubość osnowy wynosi $do_{sn} = 1,01 \pm 0,25 \mu m$.	112
Rys. 4.9.	Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLLA (MR7). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.	113
Rys. 4.10.	Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLLA (MR8). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.	113
Rys. 4.11.	Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MR9). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.	113
Rys. 4.12.	Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MR10). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.	113
Rys. 4.13.	Zmiana kąta zwilżania w czasie dla materiałów zawierających Rodaminę B. Maksymalny błąd pomiaru dla trzech powtórzeń wynosił 8%.	114
Rys. 4.14.	Mikroskopia fluorescencyjna Rodaminy B obecnej w nanowłóknach. a) Brak widocznych obszarów o intensywniejszej fluorescencji Rodaminy B na włóknach. b) Nanowłókna przędzone w układzie rdzeń – osnowa z widocznymi koralikami fazy wodnej c) Mikroskopia konfokalna Rodaminy B w nanowłóknie wytworzonym techniką rdzeń - osnowa d) Ukierunkowanie nanowłókien w materiale e) Przekrój trójwarstwowego materiału. Środkowa warstwa zawiera Rodaminę B. Nanowłókna na rysunkach a-d zbierano na szkiełka mikroskopowe.	115
Rys. 4.15.	Profil uwalniania Rodaminy B z trzech materiałów sporządzonych z polimerów: PLC (MR2), PDLG (MR9) oraz PLLA (MR1). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.	116
Rys. 4.16.	Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PLC o strukturze włókien monolitycznych (MR2) oraz włókien typu rdzeń w osnowie (MR6). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.	117
Rys. 4.17.	Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PLC o różnej budowie makroskopowej. Materiał standardowy (MR2) posiadał substancję fluorescencyjną we wszystkich włóknach. Materiał typu kanapka (MR5) (tej samej grubości co materiał standardowy) zawierał Rodaminę B w środkowej warstwie materiału. Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.	118
Rys. 4.18.	Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PDLG o strukturze włókien: ułożonych przypadkowo w materiale (MR9) oraz ukierunkowanych (MR3). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.	119
Rys. 4.19.	Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PLLA o strukturze włókien: ułożonych przypadkowo w materiale (MR1) oraz ukierunkowanych (MR8). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.	119

- Rys. 4.20. Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PDLG zawierających różne stężenie substancji fluorescencyjnej: 4,4% wag. (MR4), 2,8% wag. (MR9) oraz 1,1% wag. (MR10) względem masy polimeru. Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych. 120
- Rys. 4.21. Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PLLA zawierających różne stężenie substancji fluorescencyjnej: 2,7% wag. (MR1) oraz 1,4% wag. (MR7) względem masy polimeru. Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych. 121
- Rys. 4.22. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC zawierających 5% alfa-tokoferolu (MT1). 122
- Rys. 4.23. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC zawierających 10% alfa-tokoferolu (MT2). 122
- Rys. 4.24. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC zawierających 15% alfa-tokoferolu (MT3). 123
- Rys. 4.25. Profil uwalniania alfa-tokoferolu z materiałów o różnych początkowych zawartościach leku w materiale: 5% (MT1), 10% (MT2), 5% (MT3). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych. 124
- Rys. 4.26. Wpływ powtarzalności elektroprzędzenia na profil uwalniania alfa-tokoferolu. Porównano trzy takie same materiały wytworzone w różnym czasie. Punkty przedstawiają uśrednione wartości pomiarów. Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych. 124
- Rys. 4.27. Wpływ sterylizacji tlenkiem etylenu na profil uwalniania alfa-tokoferolu. Porównano dwa fragmenty tego samego materiału. Punkty przedstawiają uśrednione wartości pomiarów. Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych. 125
- Rys. 4.28. Nanowłókna powstałe z elektroprzędzenia emulsji. Zdjęcie wykonano na mikroskopie fluorescencyjnym, barwnik – fluoresceina. 127
- Rys. 4.29. Wpływ składu roztworów na dynamikę napięcia powierzchniowego. 128
- Rys. 4.30. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MBF1). Prawidłowa morfologia włókniny. 131
- Rys. 4.31. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MBF2). Widoczne częściowe posklejanie nanowłókien. 131
- Rys. 4.32. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLLA (MBF3). Prawidłowa morfologia włókniny. 131
- Rys. 4.33. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC elektroprzędzonych techniką rdzeń w osnowie (MBF4). Widoczna duża ilość cienkich włókien, powstałych w wyniku wtórnego elektroprzędzenia ze strugi polimeru. 131
- Rys. 4.34. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC o zawartości 2,5% fazy wodnej wzgl. polimeru (MBF5). Widoczne częściowe posklejanie nanowłókien. 131
- Rys. 4.35. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC o zawartości 5% fazy wodnej wzgl. polimeru (MBF6). Widoczne bardzo duże posklejanie nanowłókien. 131
- Rys. 4.36. Profil uwalniania białka BSA-FITC z trzech materiałów sporządzonych z polimerów: PLC (MBF6), PDLG (MBF1) oraz PLLA (MBF3). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych. 132

- Rys. 4.37. Profil uwalniania białka BSA-FITC z materiałów PLC o strukturze włókien monolitycznych (MBF5) oraz włókien typu rdzeń w osnowie (MBF4). Widoczne stopniowe uwalnianie białka z włókien wykonanych standardową techniką elektroprzędzenia emulsji oraz skokowe uwolnienie białka z włókien typu rdzeń w osnowie. Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych. 133
- Rys. 4.38. Profil uwalniania białka BSA-FITC z materiałów PLC elektroprzędzonych z emulsji dla różnych zawartości surfaktantu w materiale: 4% (MBF2) oraz 2% (MBF5). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych. 134
- Rys. 4.39. Profil uwalniania BSA-FITC z materiałów PLC elektroprzędzonych z emulsji dla różnych zawartości fazy wodnej w materiale: 5% (MBF6) oraz 2% (MBF5). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych. 134
- Rys. 4.40. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 4,7% fazy wodnej (materiał MN1) (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji. 137
- Rys. 4.41. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 2,5% fazy wodnej MN2 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji. 137
- Rys. 4.42. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 13% fazy wodnej MN3 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji. 138
- Rys. 4.43. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 4,7% fazy wodnej MN4 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału uniemożliwiające odróżnienie włókien. 138
- Rys. 4.44. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 6% fazy wodnej MN5 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału uniemożliwiające odróżnienie włókien. 138
- Rys. 4.45. Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC elektroprzędzonego techniką rdzeń - osnowa MN6 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Materiał w rdzeniu nanowłókna zawierał 25% gliceryny. Widoczna prawidłowa morfologia włókniny. 139
- Rys. 4.46. Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC elektroprzędzonego techniką rdzeń - osnowa MN7 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny. 139
- Rys. 4.47. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu BDNF w 5% fazy wodnej MB1 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji. 139
- Rys. 4.48. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu BDNF w 5% fazy wodnej MB2 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji. 140
- Rys.4.49. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu BDNF w 7% fazy wodnej MB3 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji. 140

Rys. 4.50.	Profile uwalniania białka NGF z materiałów elektroprzędzonych różnymi metodami (włókna z emulsji i rdzeń - osnowa) oraz bez i z zawartością gliceryny w rdzeniu włókna (porównanie materiałów MN1, MN5, MN6). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.	141
Rys. 4.51.	Profile uwalniania białka NGF z materiałów o różnej zawartości surfaktantu: 2% wag. (MN4) i 4% wag. (MN1). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.	142
Rys. 4.52.	Profile uwalniania białka BDNF z materiałów o różnej zawartości surfaktantu 2% wag. (MB1) i 4% wag. (MB2). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.	142
Rys. 4.53.	Profile uwalniania białka NGF z materiałów o różnej zawartości fazy wodnej: 13% wag. (MN3), 6% wag. (MN5), 4,7% wag. (MN1), 2,5% wag. (MN2).	143
Rys. 4.54.	Profile uwalniania białka BDNF z materiałów o różnej zawartości fazy wodnej: 7% wag. (MB3), 5% wag. (MB1).	143
Rys. 4.55.	Dwie klatki badania metodą FRAP wykonanego w celu określenia współczynnika dyfuzji Rodaminy B pomiędzy nanowłóknami. a) preparat hydrożelu PVA tuż po wyświeceniu, b) ten sam preparat po 100 sekundach badania, c) preparat hydrożelu PVA z nanowłóknami ułożonymi w sposób przypadkowy tuż po wyświeceniu, d) ten sam preparat po 20 sekundach badania, e) preparat hydrożelu PVA z nanowłóknami ułożonymi w sposób ukierunkowany tuż po wyświeceniu, f) ten sam preparat po 20 sekundach badania.	146
Rys. 4.56.	Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MBF1).	147
Rys. 4.57.	Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MBF2).	147
Rys. 4.58.	Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MBF1). Materiał analizowany po czterech dniach procesu uwalniania w hydrożelu PVA. $d = 1,03 \pm 0,34$	147
Rys. 4.59.	Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MBF2). Materiał analizowany po czterech dniach procesu uwalniania w hydrożelu PVA. $d = 1,16 \pm 0,40$	147
Rys. 4.60.	Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PLLA, zawierający 2,7% Rodaminy B (MR1). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	148
Rys. 4.61.	Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR1. Poszczególne punkty przedstawiają stężenie dla różnych czasów eksperymentu. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	149
Rys. 4.62.	Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PLC, zawierający 2,8% Rodaminy B (MR2). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	149
Rys. 4.63.	Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR2. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	150
Rys. 4.64.	Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PDLG, zawierający 2,8% Rodaminy B (MR3). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	150
Rys. 4.65.	Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR3. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	151
Rys. 4.66.	Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PDLG, zawierający 4,4% Rodaminy B (MR4). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	151
Rys. 4.67.	Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR4. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	152

Rys. 4.68.	Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał warstwowy, wykonany z polimeru PLC, zawierający 2,7% Rodaminy B (MR5). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	152
Rys. 4.69.	Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR5. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	153
Rys. 4.70.	Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PLC, zawierający 1,0% Rodaminy B (MR6). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	153
Rys. 4.71.	Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR6. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	154
Rys. 4.72.	Stężenie białka BSA-FITC w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PDLG, zawierający 2,7% BSA-FITC (MBF1). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	155
Rys. 4.73.	Stężenie białka BSA-FITC w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MBF1. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	155
Rys. 4.74.	Stężenie białka BSA-FITC w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PLC, zawierający 2,7% BSA-FITC (MBF2). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	156
Rys. 4.75.	Stężenie białka BSA-FITC w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MBF2. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).	156
Rys. 4.76.	Stężenie (^{125}I)NGF w funkcji odległości od materiału polimerowego dla a) 1 i b) 4 dni c) 7 i d) 14 dni od implantacji. Dane eksperymentalne stężenia NGF w funkcji odległości od materiału implantowanego w modelu zwierzęcym wykorzystano z pracy Krewsona i Saltzmana [116].	160
Rys. 4.77.	Wpływ prędkości maksymalnej (m/s) na masę składnika przeniesioną z materiału do płynu (okrągłe czarne punkty) oraz domeny reprezentującej tkankę (okrągłe białe punkty). Dodatkowo, przedstawiono masę składnika opuszczającą układ wraz z płynem (szare trójkąty). Przedstawione dane otrzymano w wyniku obliczeń komputerowych dla czasu równego 3 dni.	161
Rys. 4.78.	Wpływ prędkości płynu na gęstość strumienia składnika opuszczającego domenę wraz z płynem.	162
Rys. 4.79.	Wpływ częstości akcji serca na przebieg maksymalnej prędkości płynu mózgowo rdzeniowego (Równanie 3.88). Przebieg ten zastosowano jako warunek brzegowy w symulacjach komputerowych modelu dwuwymiarowego, rozszerzonego.	162
Rys. 4.80.	Wpływ częstości pulsacji na gęstość strumienia składnika opuszczającego domenę wraz z płynem. Do obliczeń wykorzystano prędkość $u_{\max} = 0,5$ (mm/s).	163
Rys. 4.81.	a) Widok boczny siatki nanowłókien dla fragmentu modelowanego materiału, długość boku sześciangu równa $100 \mu\text{m}$ b) Widok powierzchni nanowłókien.	164
Rys. 4.82.	Kolejne etapy tworzenia geometrii obliczeniowej, domena obliczeniowa i umieszczone w niej nanowłókna.	165
Rys. 4.83.	Przekrój poprzeczny domeny dla włókien ułożonych równomiernie, $r_1 = 2,5 \mu\text{m}$, $K_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon_i = 0,52$.	168
Rys. 4.84.	Przekrój poprzeczny domeny dla włókien skupionych w wiązce $r_1 = 2,5 \mu\text{m}$, $K_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon_i = 0,52$.	168
Rys. 4.85.	Stężenie leku w płynie pomiędzy równomiernie rozłożonymi włóknami ($\mu\text{g/ml}$); $r_1 = 2,5 [\mu\text{m}]$, $K_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon = 0,52$.	169
Rys. 4.86.	Stężenie leku w płynie pomiędzy włóknami skupionymi w wiązce ($\mu\text{g/ml}$); $r_1 = 2,5 [\mu\text{m}]$, $K_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon = 0,52$.	169
Rys. 4.87	Wpływ porowatości i zagęszczenia włókien na szybkość uwalniania leku.	170
Rys. 4.88.	Włókna ułożone przypadkowo w płaszczyźnie XY, idealnie ukierunkowane, $r_1 = 2,5 [\mu\text{m}]$, $K_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon = 0,53$.	171

Rys. 4.89.	Obliczone stężenie leku w płynie pomiędzy przypadkowo ułożonymi włóknami po 14 dniach od rozpoczęcia uwalniania w przekroju poprzecznym domeny, $r_1 = 2,5$ [μm], $K_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon = 0,53$.	171
Rys. 4.90.	Wpływ porowatości maty dla przypadkowo ułożonych włókien w płaszczyźnie XY na szybkość uwalniania leku	172
Rys. 4.91.	Włókna równomiernie rozłożone, idealnie ukierunkowane, stopień ukierunkowania $K_t = [0 \ 0 \ 1]$, $r = 2,5 \mu\text{m}$.	173
Rys. 4.92.	Włókna nieregularne, umiarkowanie ukierunkowane, stopień ukierunkowania $K_t = [0,16 \ 0,14 \ 0,70]$, $r = 2,5 \mu\text{m}$.	173
Rys. 4.93	Włókna ułożone nieregularnie o jednakowym promieniu, $r = 1,6 \mu\text{m}$. Stopień ukierunkowania $K_t = [0,39 \ 0,31 \ 0,30]$.	173
Rys. 4.94.	Włókna ułożone nieregularnie, Gaussowski rozkład promieni włókien, $\bar{r} = 1,6 \mu\text{m}$, $\sigma = 0,6 \mu\text{m}$, Stopień ukierunkowania $K_t = [0,36 \ 0,33 \ 0,31]$.	173
Rys. 4.95.	Wpływ ukierunkowania i rozkładu promieni włókien na szybkość uwalniania leku	175
Rys. 5.1.	Widok na rozrost uszkodzenia mózgu szczura, po przeprowadzonym chirurgicznym uszkodzeniu mózgu bez nałożonego opatrunku z nanowłókien. Zdjęcie pochodzi z pracy [106].	178
Rys. 5.2.	Spodziewane profile uwalniania leków do tkanki mózgowej. a) alfa-tokoferol (MT1), b) czynnik wzrostu NGF (MN4), c) czynnik wzrostu BDNF (MB1).	180
Rys. 5.3.	Blizna glejowa po urazie mózgu. Znakowanie na obecność GFAP (kwaśnego białka włóknienkowego). A) grupa kontrolna, B) 4 dni po operacji – rana nieopatrzona, C) 4 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem, D) 14 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem, E) 30 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem. Zdjęcia pochodzą z pracy [148], [157].	183
Tab. 1.1.	Wykładnik n w modelu Peppasa wyznaczony dla różnych geometrii i mechanizmów uwalniania [87].	31
Tab. 2.1.	Stosowane leki i ich analogi	49
Tab. 2.2.	Stężenia składników do oznaczenia alfa-tokoferolu.	53
Tab. 3.1.	Zakresy parametrów zastosowane w obliczeniach.	81
Tab. 3.2.	Zakresy parametrów zastosowane w obliczeniach.	88
Tab. 3.3.	Zakresy parametrów zastosowane w obliczeniach.	94
Tab. 3.4.	Parametry prędkości płynu mózgowo - rdzeniowego oraz wysokość przestrzeni podpajęczynówkowej.	101
Tab. 3.5.	Zakresy parametrów zastosowane w obliczeniach	104
Tab. 4.1.	Parametry badanych materiałów zawierających Rodaminę B.	110
Tab. 4.2.	Parametry badanych materiałów zawierających alfa-tokoferol.	122
Tab. 4.3.	Wyniki pomiaru średnicy kropeł emulsji w roztworze polimeru PLC 9% wag. z fazą wodną.	129
Tab. 4.4.	Parametry badanych materiałów zawierających białko BSA-FITC.	130
Tab. 4.5.	Parametry badanych materiałów zawierających czynniki wzrostu NGF i BDNF. Wszystkie materiały wykonano z polimeru PLC.	136
Tab. 4.6.	Współczynniki kinetyczne k_a , k_d , k_c otrzymane w modelach numerycznych (makroskopowym i mikroskopowym) dla materiałów analizowanych w hydrożelu PVA oraz buforze PBS.	157
Tab. 4.7.	Parametry modelu dla trzech wartości porowatości. Górne cztery parametry wspólne dla każdego przypadku. Pozostałe: stopień zagęszczenia i obliczony współczynnik dyfuzji dla materiałów $i = 1, 2, 3$ różne w zależności od struktury.	168
Tab. 4.8.	Charakterystyka ukierunkowania włókien w symulacjach numerycznych dla porowatości $\varepsilon = 0,72$	174
Tab. 5.1.	Zestawienie badanych materiałów zastosowanych w modelu zwierzęcym.	179

Wprowadzenie

1.1. Systemy uwalniania leków

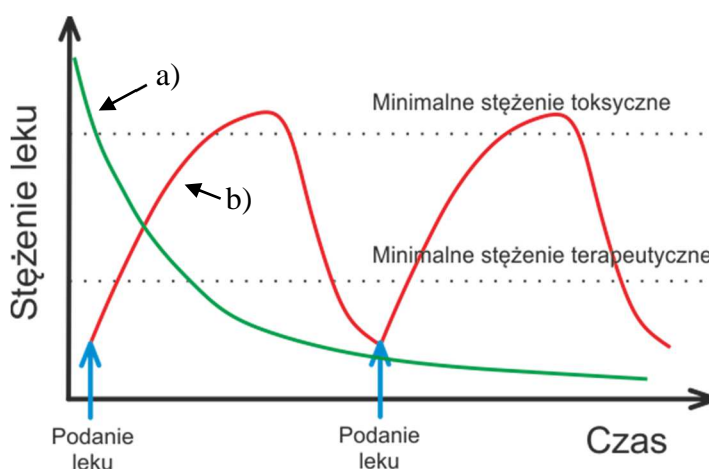
Pierwsze zapisy traktujące o zażywaniu substancji celem poprawy stanu zdrowia ludzkiego czy też w celach psychoterapeutycznych sięgają czasów starożytnego Egiptu (6000 – 3000 lat temu) [1]. Egipscy medycy aplikowali środki uspokajające i przeciwbólowe a do leczenia bardzo często stosowali wino, olej rycynowy oraz opium [1]–[3]. Próby zmian w formulacji leków i/lub miejsca ich podania celem osiągnięcia produktów o przewidywalnym rezultacie ich dostarczania, dotyczą głównie wprowadzenia powlekania tabletek oraz podskórnego implantowania leków w postaci tabletek [4]. Powlekanie pigułek keratyną zastosowane przez dr. Paula Unna, pozwoliło na ominięcie etapu rozpuszczania i wchłaniania leku w żołądku i dotarcie pigułki w niezmienionej postaci do jelit [4]. W latach 40 XIX w., opisano metodę podskórnego wprowadzania morfiny stosowaną przez dr Lafargue’a, która polegała na zanurzeniu nakłuwacza w morfinie, wprowadzeniu go na kilka sekund pod skórę i wyjęciu, co po kilku nakłuciach doprowadzało do stanu senności. W późniejszym czasie dr Lafargue za pomocą igły wprowadził podskórnie implant zawierający morfinę. Blisko sto lat później w 1937 roku Deanesly i Parkes przebadali efekty podskórnego wprowadzenia tabletek z hormonami [4]. Związki uwalniano z kryształów wprowadzonych w postaci sypkiej lub sprasowanych tabletek. Po otrzymaniu pozytywnych wyników na zwierzętach, rok później Bishop wykorzystał przedstawioną technikę podania hormonów w eksperymentach klinicznych [5].

Współczesna historia systemów kontrolowanego uwalniania leków sięga lat 60 XX w., kiedy Judah Folkman (National Naval Medical Center, USA) zastosował kapsułki z gumy silikonowej (Silastic®) zawierające między innymi digitoksynę (substancja z grupy leków nasercowych) w badaniach na zwierzętach [6]. Kapsułki o przedłużonym uwalnianiu leku zostały zaimplantowane w mięśniu sercowym lewej komory, w którym wcześniej wykonano chirurgicznie wywołaną arytmie serca. Wyniki elektrokardiogramu wykazały równomierną pracę serca, jednakże zauważono degenerację i zwłóknienie mięśnia sercowego w miejscu implantacji. Jednocześnie za sprawą Alejandro Zaffaroniego (Alza, USA) zrodziła się koncepcja systemów kontrolowanego podawania leków o stałej szybkości uwalniania (niezależnej od stężenia). Założył on firmę Alza, która jako pierwszy zaprojektowała a następnie wprowadziła na rynek w 1974 produkt Ocusert® Pilo, wkładkę do oka uwalniającą przez siedem dni lek przeciw jaskrze – pilokarpinę [7], [8]. W ramach działalności firmy opatentowano wiele platform uwalniania leków (ALZAMER® Depot - technologia zastosowania biodegradowalnych polimerów do uwalniania leków, OROS® - osmotycznie kontrolowane uwalnianie leków z tabletek podawanych doustnie). W 1976 Robert Langer i Judah Folkman [9] opublikowali ważne wyniki prezentujące możliwość kontrolowanego uwalniania leków wielkocząsteczkowych z niedegradowalnych polimerów. Okazało się, że podczas uwalniania albuminy surowicy bydlęcej (BSA), białko które znajdowało się blisko powierzchni rozpuszczało się tworząc pory w które następnie penetrował rozpuszczalnik w konsekwencji wymywając białko z polimerowego nośnika. Zastosowanie biodegradowalnych polimerów opartych na kwasie mlekowym, pozwoliło na stworzenie szeregu produktów w tym nano i mikrocząstek zawierających leki. Pierwszym produktem wprowadzonym na rynek zawierającym mikrocząstki był Lupron Depot® (Abbott), stosowany w leczeniu raka prostaty i terapii hormonalnej. Jest to preparat domięśniowy, zawierający mikrocząstki polimeru PLGA (poli(laktyd-co-glikolid)) z octanem leuprolidu (naśladującym hormon gonadotropowy LH stymulujący produkcję testosteronu), o czasie uwalniania wynoszącym od jednego do czterech miesięcy. W 1996 Amerykańska Administracja Żywności i Leków (FDA) wydała pozwolenie na użycie produktu Gliadel™ używanego do wypełniania przestrzeni pooperacyjnej powstałej po wycięciu glejaka wielopostaciowego. Produkt w którym nośnikiem leku jest polimer z grupy polibezwodników o kontrolowanej szybkości powierzchniowej degradacji, uwalnia karmustynę (chemioterapeutyk) o bardzo krótkim czasie półtrwania w organizmie. Dzięki

zastosowaniu ww. produktu obecność toksycznej karmustyny jest zlokalizowana jedynie w okolicach usuniętego guza, minimalizując skutki uboczne.

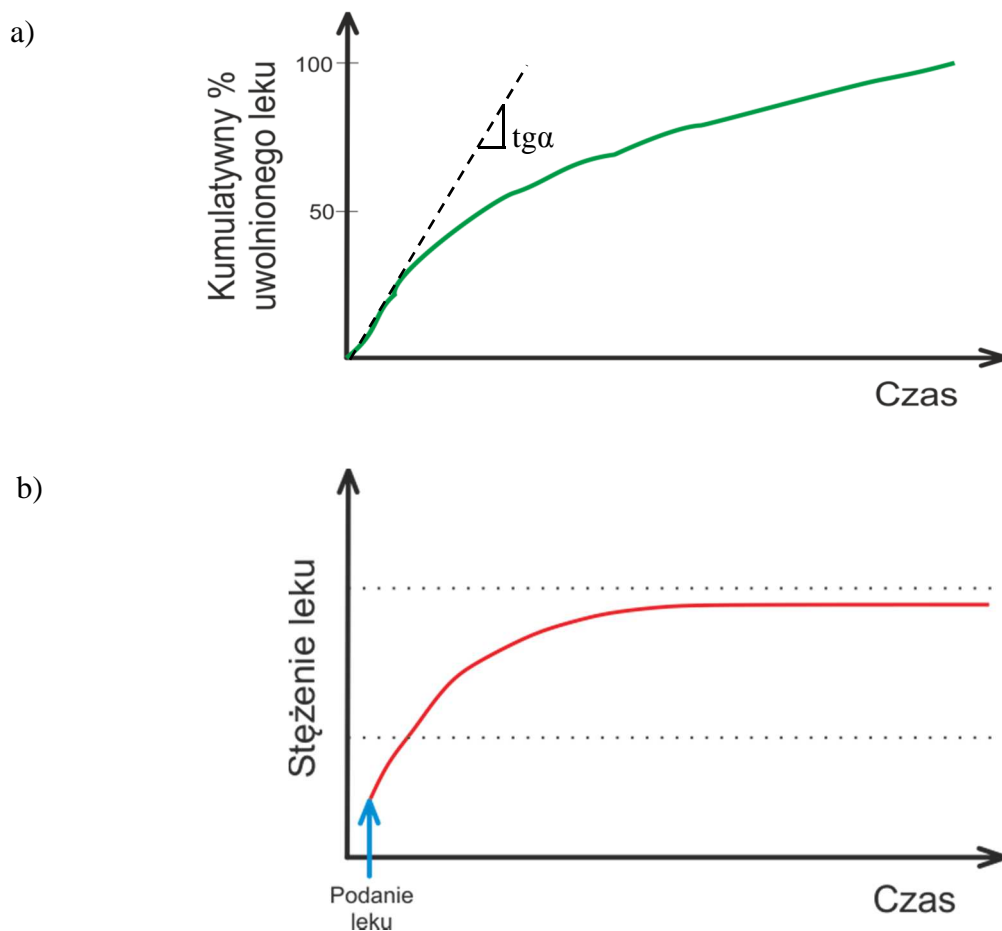
W wyniku podania leku jego stężenie w ustroju początkowo wzrasta. Efekt terapeutyczny uzyskuje się w przypadku przekroczenia minimalnego stężenia i w trakcie późniejszego jego utrzymania w określonym przedziale zwanym oknem terapeutycznym, przez określony czas terapii. Przekroczenie dawki leku powoduje wkroczenie w obszar stężenia toksycznego i związanych z tym zaburzeń czy też śmierci komórek. Należy mieć na uwadze iż duża ilość leków posiada bardzo wąskie okno terapeutyczne, co sprawia że zbyt wczesne przyjęcie kolejnej dawki leku może prowadzić do przedawkowania.

W przypadku potrzeby szybkiego wywołania efektu terapeutycznego, stosuje się dożylnie podanie leku w postaci iniekcji lub infuzji co zapewnia bardzo szybką dystrybucję leku w całym organizmie. Po podaniu dożylnym następuje gwałtowny wzrost stężenia leku w ustroju (Rys. 1.1a) a następnie eksponencjalny spadek związany z eliminacją składnika leczniczego. Podanie leku w postaci pozanaczyniowej np. połknięcie tabletki z substancją czynną powoduje stopniowy wzrost stężenia leku w ustroju i następny jego spadek. Aby utrzymać stężenie leku w oknie terapeutycznym konieczne jest ponowne podanie leku.



Rys. 1.1 Wykres przedstawiający przebieg stężenia leku w ustroju w czasie po podaniu leku: a) dożylnie, b) doustnie w postaci tabletek.

Podawanie leków z systemów terapeutycznych o kontrolowanej szybkości uwalniania niesie ze sobą wiele korzyści dla pacjenta. Dopasowanie terapii umożliwiającej pozostanie przez cały czas w oknie terapeutycznym oraz zmniejszenie dawkowania leku przekłada się na ulżenie trudom pacjenta związanym z przyjmowaniem leków w formie zastrzyków. Bardzo często możliwe jest wprowadzenie leku w takich nośnikach, które docierają do miejsca choroby i uwalniają lek miejscowo.



Rys. 1.2 a) Przykładowy profil kontrolowanego uwalniania leku. Chwilowa szybkość uwalniania jest równa tangensowi kąta nachylenia stycznej w danym punkcie. b) Wyidealizowany przebieg stężenia leku w ustroju w czasie po podaniu leku z systemu kontrolowanego uwalniania.

Wybór nośnika leku uzależniony jest od wielu czynników i stanowi duże wyzwanie projektowe. Materiał z którego wykonany jest nośnik leku musi być biozgodny czyli posiadać zdolność do prawidłowego zachowania w kontakcie z tkanką w określonym zastosowaniu, biodegradowalny - inaczej zdolny do resorpcji bez powstania szkodliwych produktów degradacji. Zdolność do enkapsulacji/uwięzienia dużej ilości leku w matrycy oraz zachowanie stabilności leku (struktury i aktywności) w warunkach fizjologicznych przez długi okres czasu jest jednym z kryteriów wyboru leku i materiału. Nośnik nie może wywoływać reakcji zapalnej oraz jeśli jest wykorzystywany w inżynierii tkankowej, powinien posiadać odpowiednie własności mechaniczne [10]. Korzystnym wyborem z punktu widzenia inżynierii regeneracyjnej i jednoczesnego uwalniania leków są biodegradowalne materiały polimerowe (syntetyczne i naturalne), przetwarzane w dowolne postaci: nano i mikrocząstek oraz nanowłókien jak również formy makroskopowe: rurki, powierzchnie płaskie i inne trójwymiarowe struktury. Biodegradowalne polimery

syntetyczne stosowane w systemach uwalniania to głównie poliestry poli(kwas mlekowy), poli(kwas glikolowy), polihydroksyalkanolany lub polikaprolakton, polibezwodniki, poliamidy i inne [11]. Często wykorzystywane są kopolimery lub mieszaniny polimerów, dzięki czemu istnieje możliwość kontroli czasu degradacji matrycy polimerowej. Do skonstruowania materiałów o większej biogodności, polimery syntetyczne stosowane są z polimerami naturalnymi: kolagenem, albuminą czy też żelatyną. Zwiększenie hydrofilowości poli(kwasu mlekowego) można uzyskać przez zastosowanie kopolimeru z poli(tlenkiem etylenu) [10]. Sprzężenie białek z poli(kwasem mlekowym) i lepsza funkcjonalizacja materiału możliwa jest dzięki zastosowaniu kopolimeru z L-lizyną [12]. Zmiany własności fizycznych i chemicznych polimerów a także połączenie ze składnikami pozwalającymi na celowane uwalnianie leków pozwoli na skuteczniejsze podanie szerokiej gamy leków.

Najpowszechniej stosowane nośniki leków to nano i mikrocząstki wykonane głównie z biodegradowalnych polimerów i białek. Średnica nanocząstek może wynosić 10 – 250 nm, jednak jedynie nośniki mniejsze niż 100 nm mogą swobodnie wnikać w głąb komórek [13]. W przypadku nano i mikrocząstek lek może być rozpuszczony w matrycy, uwięziony pomiędzy dużymi cząsteczkami polimeru, zakapsułkowany w membranie polimerowej lub związany do powierzchni wiązaniami chemicznymi. Istnieje również szereg technik modyfikowania powierzchni nanocząstek celem ukrycia ich przed komórkami układu odpornościowego (*stealth*) poprzez np.: doczepienie polimeru o krótkich łańcuchach poli(glikolu etylenowego) PEG lub surfaktantu (Tween® 80), czy też zmniejszenie szybkości adsorpcji białek z krwi na powierzchni nanocząstek [14]. Dołączenie do powierzchni nanocząstki przeciwciała może zaowocować powstaniem cząstki specyficznej względem danego antygeny i służyć w terapii celowanej [15]. Cząstki otrzymuje się głównie metodą wytrącania w płynie nadkrytycznym oraz metodą inwersji faz. Otrzymane cząstki powinny również wykazywać bioadhezję co zwiększy zdolności absorpcyjne komórek (endocytoza) oraz zapewni dłuższy czas przebywania w organizmie [16]. Inną metodą otrzymywania mikrocząstek jest polimeryzacja emulsji, gdzie z wodnego roztworu białka oraz oleju tworzy się emulsję a następnie poprzez dodanie glutaraldehydu dochodzi do usieciowania białka i stworzenia mikrocząsteczek [17]. Tę metodę stosowano do uwięzienia leków przeciwzapalnych (ketoprofen, diklofenak). Czas uwalniania leków z nanocząstek jest krótki, w zależności od metody oraz użytego polimeru wynosi on od kilkadziesiąt minut (chitozan, alginian) do kilku dni (PLGA) [18], [19]. Wydłużenie czasu uwalniania

leku możliwe jest dzięki kowalencyjnemu połączeniu leku z polimerem. Pozwoliło to na osiągnięcie czasu uwalniania rzędu 25 dni [14].

Liposomy to pęcherzyki zbudowane z podwójnej warstwy lipidowej, o średnicy 10 – 2000 nm [20], wypełnione wodnym roztworem leku lub w niektórych przypadkach kryształami leku. Ich otoczka jest zbudowana analogicznie do błon biologicznych. Liposomy chronią zakapsułkowany lek przed zbyt wczesnym usunięciem z ustroju, dodatkowo dzięki pokryciu powierzchni zewnętrznej polimerem poli(glikolem etylenowym) PEG lub surfaktantem, możliwa jest ochrona przed opsoninami – białkami rozpoznającymi antygen i dającymi sygnał makrofagom do ich usunięcia. Koncepcja zwiększająca czas cyrkulacji liposomu w układzie krążenia polega na ciasnym upakowaniu elastycznych łańcuchów polimeru PEG, nie pozwalając innym makrocząsteczkom na dostanie się do powierzchni liposomów przez żelową warstewkę polimeru. Wydłużenie czasu półtrwania skutkuje akumulacją nośników leku w guzach nowotworowych, głównie dzięki dużej przepuszczalności pomiędzy komórkami nabłonka oraz braku odprowadzenia limfy z nowotworu [21]. Problemem w przypadku liposomów bez warstwy ochronnej jest ich niestabilność w obliczu kontaktu z lipoproteinami, skutkująca przerwaniem podwójnej warstwy lipidowej i uwolnieniem całej zawartości leku do krwi [22].

Hydrożele tworzą trójwymiarową sieć swobodnie rozmieszczonych łańcuchów polimerowych zawierającą w wielu przypadkach przeważającą ilość wody. W systemach podawania leków stosowane są jako preparaty do iniekcji lub zastosowań zewnętrznych. Duża zawartość wody i luźna struktura łańcuchów polimeru w stosunkowo niewielkim stopniu hamuje dyfuzyjny transport masy. Kontrola uwalniania może odbywać się poprzez: zmianę struktury sieci indukowaną zmianą pH, temperatury, stopnia usieciowania łańcuchów polimerów oraz połączeniem leku z łańcuchem polimeru. Dzięki zmniejszeniu odległości pomiędzy łańcuchami polimeru, współczynnik dyfuzji efektywnej ulega zmniejszeniu wydłużając czas transportu leków. Czas uwalniania leków z hydrożeli waha się od kilku godzin dla małych cząsteczkowych leków do kilku dni w przypadku uwalniania dużych cząsteczek białek. Interesującą grupę stanowią hydrożele typu „smart” w których dochodzi do zmian szybkości uwalniania leków pod wpływem czynników otoczenia np. temperatury, pH czy też obecności glukozy [23].

Inne nośniki to wirusopodobne cząsteczki (tzw. wektory) zbudowane z białka adenowirusa i zdolne do przenoszenia materiału biologicznego do komórek. Stosowane są jako nośniki antygenów szczepionek oraz czynników terapeutycznych do tkanek

nowotworowych. Przyczepienie składników aktywnych do powierzchni wektora może nastąpić za pomocą wiązania kowalencyjnego lub poprzez utworzenie kompleksu. Podanie leku w formie kompleksu z wektorem znacząco zwiększa biodostępność leku dzięki czemu możliwe jest nawet 100-krotne zmniejszenie dawki leku [24].

1.2. Nanowłókna

W ostatnich kilku latach pojawiły się systemy uwalniania leków oparte o nanowłókna powstałe w procesie elektroprzędzenia roztworu polimeru lub jego rozdmuchu [25]–[28]. Dzięki swojej budowie przypominającej macierz zewnątrzkomórkową, dużej porowatości umożliwiającej transport czynników wzrostu komórek, substancji odżywczych i produktów metabolizmu komórek, nanowłókna są dobrym materiałem w inżynierii tkankowej jako trójwymiarowe rusztowania dla komórek. W przeciwieństwie do hydrożeli, sieć nanowłókien ma dobre własności mechaniczne.

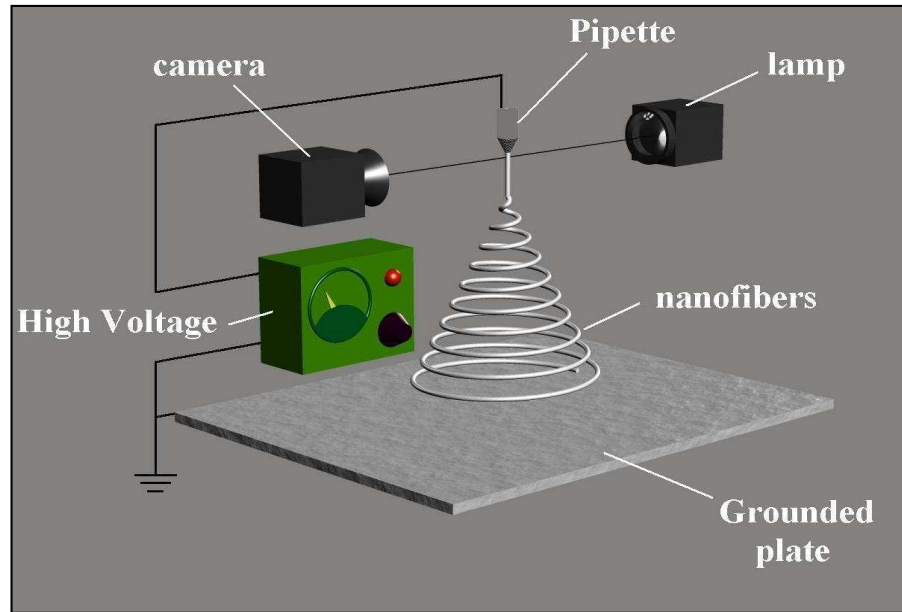
Wytwarzanie nanowłókien metodą elektroprzędzenia związane jest z oddziaływaniem silnego pola elektrycznego ze strugą płynu. Pierwsze doświadczenia z tym związane mogą być znalezione w pracach z 1600 roku, kiedy podejmowano próbę zrozumienia zjawisk elektrostatycznych [29]. W tym czasie William Gilbert (nadworny fizyk królowej Elżbiety I) zauważył, że naładowany kawałek bursztynu będący w odpowiedniej odległości od leżącej na suchej powierzchni kropli wody, przyciąga kropelki i wyciąga je na kształt stożka [30]. Do roku 1888 Charles V. Boys (W. Brytania) podjął wiele prób związanych z przędzeniem naturalnych żywic pozyskiwanych z wydzieliny owadów jak również elektroprzędzeniem roztopionego wosku pszczelego na potrzeby wykonania cienkiego włókna wykorzystywanego w wadze skręceń do pomiarów bardzo małych sił. Ostatecznie, metodą wyciągania nici z roztopionego szkła kwarcowego i naciągania włókna na drewnianą szpulę, naukowiec osiągnął cel wytwarzając włókno o długości 27 metrów i średnicy około 250 nm [30]. Wraz z możliwością zastosowania techniki elektroprzędzenia w przemyśle, John Francis Cooley (USA) uzyskał patenty na metody elektroprzędzenia przy użyciu różnego rodzaju dysz: konwencjonalnej, typu współosiowego, wspomaganą przepływem powietrza oraz dyszy przędzalniczej z obrotowym dystrybutorem. Metody równoległego przędzenia wielu włókien z jednoczesnym tworzeniem przędzy były przedmiotem zainteresowania Antona Formhalsa (Niemcy), co dodatkowo zaowocowało opatentowaniem wielu rozwiązań w dziedzinie budowy dysz przędzalniczych jak również procesu formowania i odbierania włókien [31].

Matematycznego opisu i próby zrozumienia formowania włókien w polu elektrycznym podjął się Geoffrey I. Taylor (W. Brytania). Opisał on charakterystyczny kształt kropli tworzący się u nasady dyszy podającej roztwór polimeru, który nazwano w późniejszym czasie stożkiem Taylora. Dokładny opis kształtu formowanego podczas elektroprzędzenia stożka Taylora oraz wpływ najważniejszych parametrów na proces formowania włókien można znaleźć w pracach Yarina [32]–[34].

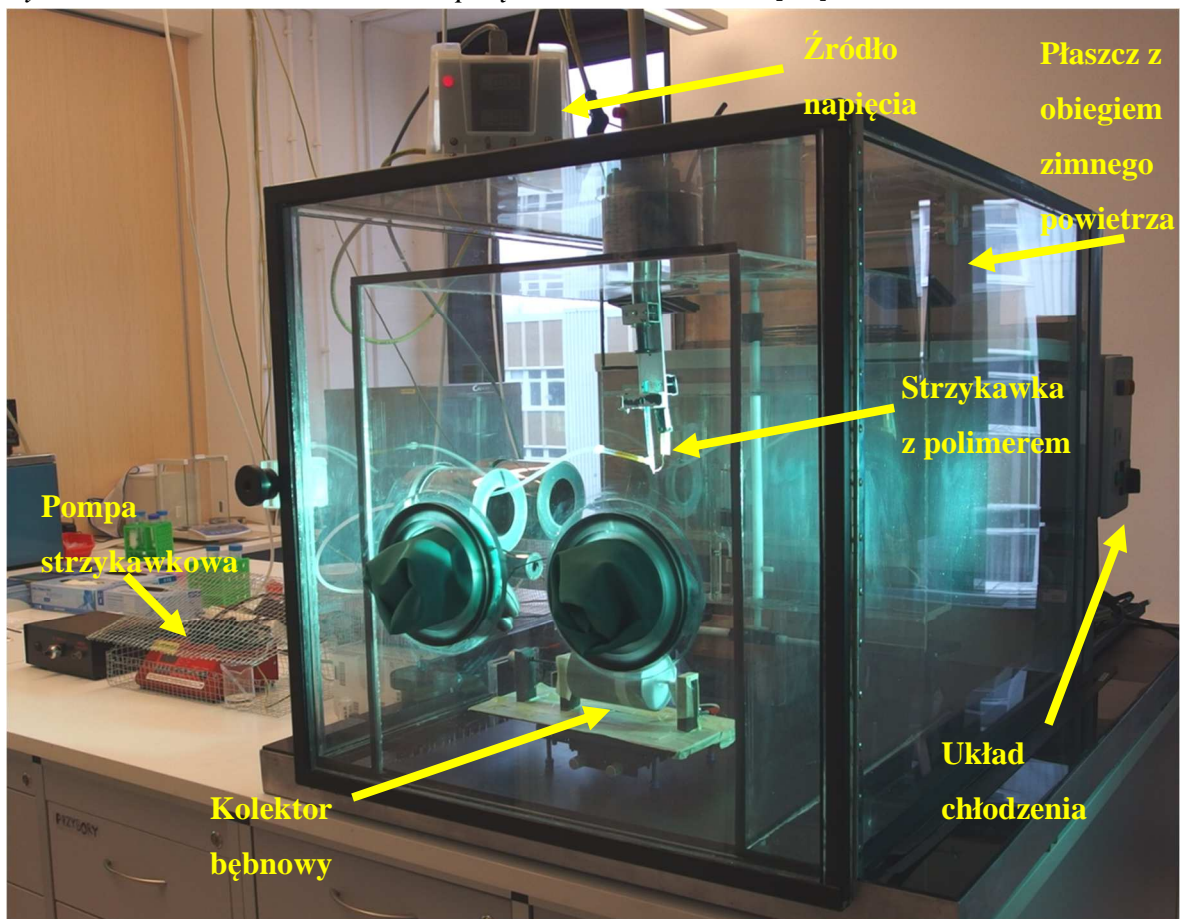
W ciągu ostatnich dwudziestu lat, nanowłókna przyciągnęły znaczne zainteresowanie z uwagi na potencjalne zastosowanie w wielu dziedzinach: począwszy od przemysłu i zastosowań we włókiennictwie, filtracji i rolnictwie po zastosowania medyczne jako materiały opatrunkowe jak i systemy kontrolowanego uwalniania leków. Liczba prac naukowych dotyczących elektroprzędzenia rosła każdego roku, osiągając około 8200 artykułów naukowych i 1900 patentów w roku 2013 [35].

1.2.1. Aparatura

Typowe urządzenie do formowania nanowłókien metodą elektroprzędzenia składa się ze strzykawki wypełnionej roztworem polimeru z dołączoną metalową dyszą, pompy strzykawkowej, uziemionego kolektora (walec obrotowy, tarcza szybkoobrotowa) oraz źródła wysokiego napięcia o zakresie 1 – 30 kV podłączonego do dyszy. W celu zwiększenia wydajności procesu elektroprzędzenia można prowadzić w układzie z wielodyszowym. W przypadku niestabilności procesu i formowania się zbyt dużych kropeł polimeru pod dyszą, występuje ryzyko oderwania się kropeł z rozpuszczalnikiem i zniszczenia produkowanego materiału. W tym celu proces można prowadzić w układzie poziomym bądź konieczna jest optymalizacja składu roztworu polimeru lub parametrów prowadzenia procesu. Mając na uwadze niestabilności w procesie elektroprzędzenia pod wpływem zmian temperatury zewnętrznej lub wilgotności, proces należy prowadzić w komorze zapewniającej kontrolowane warunki otoczenia (Rys. 1.3,1.4).



Rys. 1.3 Schemat układu do elektroprzędzenia nanowłókien [36].



Rys. 1.4 Zdjęcie stanowiska do produkcji nanowłókien w warunkach kontrolowanej atmosfery. IPPT PAN

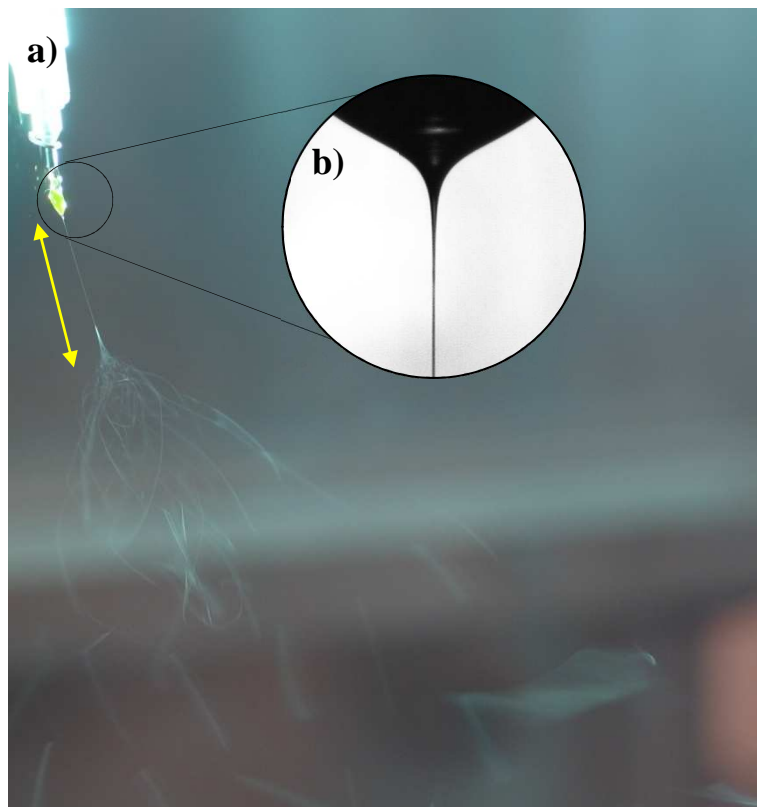
1.2.2. Prowadzenie procesu

Podczas elektroprzędzenia roztworu polimeru, do kropli roztworu zawieszonych pod metalową dyszą doprowadzony jest ładunek co prowadzi do odpychania się jednoimiennych ładunków w kropli. Po przekroczeniu granicznej wartości ładunku w kropli, przewyciężone zostają siły napięcia powierzchniowego w efekcie doprowadzając do wyrzutu strugi polimeru (Rys. 1.5a). W momencie rozpoczęcia formowania się strugi polimeru z kropli, przyjmuje ona charakterystyczny kształt zwany stożkiem Taylora [37] (Rys. 1.5b). Jeśli lepkość roztworu jest zbyt niska, struga polimeru będzie miała tendencję do rozrywania się i tworzenia kropel (*elektrospray*). Jednoimiennie ładunki odpychają się powodując wirowanie i rozciąganie strugi polimeru, jednocześnie siły lepko-sprężyste nie pozwalają na rozerwanie pocienianej strugi. Na drodze pomiędzy dyszą a kolektorem z rozciąganej strugi odparowuje rozpuszczalnik doprowadzając do zestalenia włókna, które zbierane jest na uziemionym kolektorze w formie włókniny. Rodzaj kolektora zależy od przeznaczenia materiału. Dzięki zastosowaniu odpowiednich kształtów kolektora możliwe jest tworzenie rurek lub płaskich materiałów o dużej powierzchni z włóknami ułożonymi przypadkowo i ukierunkowanie.

1.2.3. Parametry materiałowe i procesowe wpływające na morfologię nanowłókien

Ważnym parametrem wpływającym na proces elektroprzędzenia materiału jest stężenie polimeru i związana z tym lepkość roztworu. Zbyt niskie stężenie polimeru powoduje brak przędnosci roztworu lub powstawanie kropel, zbyt wysokie prowadzi do wzrostu lepkości roztworu i trudności w przepływie przez dyszę oraz ewentualnego wysychania kropli pod dyszą przed rozpoczęciem elektroprzędzenia. Dla niskich stężeń polimeru otrzymane włókna są cienkie i mogą zawierać dużą liczbę tzw. koralików czyli zgrubień [38]. Dalszy wzrost stężenia prowadzi do rozciągnięcia koralików i otrzymania włókien o bardziej jednolitej grubości. Doshi i in. [39] zbadali wpływ lepkości na elektroprzędzenie wodnego roztworu poli(tlenku etylenu) PEO. Zauważyli, że nanowłókna tworzyły się z roztworów o lepkości pomiędzy 800 – 4000 cP. Poniżej dolnej wartości, struga polimeru rozpadała się i powstawały krople. Powyżej górnej wartości, tworzenie włókien było uniemożliwione ze względu na wyschnięcie kropli roztworu pod dyszą. Na reologię roztworu ma również wpływ masa molowa polimeru. Zbyt niska masa molowa polimerów użytych do elektroprzędzenia prowadzi do powstania koralików na włóknach, z tego powodu w procesie elektroprzędzenia są używane na ogół polimery o większej masie

molowej (około 60 kDa), zapewniające właściwą lepkość. Znalezienie optymalnej lepkości roztworu poprawiającej stabilność procesu elektroprzędzenia i otrzymanie pożądanej struktury włókien jest związane ze złożonym procesem prób i błędów.



Rys. 1.5. a) Proces powstawania nanowłókien. Widoczna kropla pod dyszą tworzy stożek Taylora, z którego uwalnia się prostoliniowy odcinek strugi polimeru. Dalej widoczny jest obszar wirowania i rozciągania strugi. Czas ekspozycji zdjęcia 12,5 ms. b) Kształt rozciąganej kropli bardzo lepkiej cieczy [40].

Napięcie powierzchniowe roztworu związane jest z zastosowanym rozpuszczalnikiem i rozpuszczonym polimerem, pełni kluczową rolę w procesie tworzenia włókien. Zmniejszenie napięcia powierzchniowego sprawia, że mniejsza ilość ładunku potrzebna jest do zainicjowania wyrzutu strugi z kropli roztworu i formowania włókien. W przypadku dużego napięcia powierzchniowego, proces elektroprzędzenia jest utrudniony i możliwe jest jedynie tworzenie się spreju. Duży wpływ na nanostrukturę włókien ma odpowiednio dobrany rozpuszczalnik, który powinien charakteryzować się dużą lotnością (niska temperatura wrzenia rozpuszczalnika). Rozpuszczalniki o małej lotności, nie odparowują z włókien w całości podczas elektroprzędzenia. Po osiągnięciu kolektora włókna skleją się lub rozplaszczają przybierając kształt wstążek. W przypadku elektroprzędzenia roztworu polimeru z lekiem, istotne jest aby rozpuszczalnik nie wchodził w interakcje z substancją aktywną np. nie powodował denaturacji białek.

Istotne jest również przewodnictwo elektryczne roztworu. Fong i in. [38] badali wpływ dodatku chlorku sodu do roztworu PEO w wodzie. Autorzy stwierdzili wzrost gęstości ładunku w strudze polimeru po dodaniu soli. Zaobserwowano to w postaci zmniejszenia wartości przyłożonego potencjału elektrycznego, przy którym wyrzucana była struga polimeru z kropli. Kolejną obserwacją potwierdzającą wzrost gęstości ładunku była morfologia włókien, które były gładkie i znacznie cieńsze od włókien bez dodatku soli.

Wraz ze wzrostem różnicy potencjałów pomiędzy dyszą a kolektorem dochodzi do stopniowej zmiany kształtu kropli ze sferycznego na stożkowy i wyrzutu strugi polimeru z kropli. Krytyczna wartość napięcia przy którym rozpoczyna się elektroprzędzenie jest różna dla różnych typów roztworów polimerów. W ogólności wzrost różnicy potencjału prowadzi do zmniejszenia grubości otrzymywanych włókien lecz po przekroczeniu określonego punktu bardzo często obserwowany jest wzrost ich grubości. Zbyt duża wartość napięcia powoduje zmianę kształtu kropli prowadząc często do jej zaniku i wyrzutu strugi polimeru tuż przy dyszy. Dodatkowym problemem jest duża niestabilność procesu objawiająca się częstym przerywaniem przedzenia i zatykaniem igły.

Do zachowania stożkowego kształtu kropli (Rys. 1.5b) niezbędne jest znalezienie optymalnego objętościowego natężenia przepływu roztworu polimeru przez dyszę. Przy zbyt małym natężeniu przepływu roztworu wzrost różnicy potencjałów prowadzi do zmniejszania kropli pod dyszą z powodu porywania większej ilości polimeru w kierunku kolektora. Podniesienie wartości natężenia przepływu polimeru wpływa na wzrost grubości nanowłókien spowodowany zwiększeniem objętości kropli i tym samym początkowej grubości wyrzucanej strugi. Dalsze zwiększanie natężenia przepływu polimeru zaburza proces i powoduje gromadzenie na kolektorze włókien z nieodparowanym rozpuszczalnikiem przyczyniając się do ich sklejenia. Zwiększenie odległości pomiędzy metalową dyszą a kolektorem zwiększa drogę jaką ma do pokonania nanowłókno prowadząc do zmniejszania jego grubości i dłuższego odparowywania rozpuszczalnika.

1.3. Metody wprowadzania leków do nanowłókien

W zależności od oczekiwanego czasu uwalniania i wymagań w stosunku do polimeru, niektóre z metod zamknięcia leku we włóknie pozwalają na uwolnienie całej dawki leku w czasie od kilku godzin aż do kilkudziesięciu dni. Wybór metody zamknięcia leku jest szczególnie istotny w przypadku leków białkowych. Zachowanie stabilności białka (jego przestrzennej struktury) po procesie elektroprzędzenia oraz w trakcie przechowywania, może pomóc uniknąć zjawiska immunogenności uwalnianego składnika w organizmie.

Podstawowe metody wprowadzania leków do polimerowych nanowłókien to:

- rozpuszczenie leku w polimerze,
- rozpuszczenie leku w rdzeniu otoczonym polimerową osnową,
- zawieszenie w postaci większych cząstek np. kryształów lub kropelek fazy wodnej (elektroprzędzenie emulsji),
- przyłączenie leku do powierzchni nanowłókna.

1.3.1. Nanowłókna z homogenicznie rozmieszczonym lekiem

Substancja aktywna może być rozpuszczona w roztworze polimeru tuż przed procesem elektroprzędzenia. Technika ta jest często stosowana w konstrukcji rusztowań komórkowych celem stłumienia reakcji zapalnej tkanki lub infekcji [41]. Większość leków wykazuje homogeniczne rozprowadzanie wewnątrz włókna, jednakże leki jonowe podczas elektroprzędzenia mają tendencję do podążania ku powierzchni strugi polimeru. Wzbogacenie powierzchni lekiem może doprowadzić do jego szybkiego uwolnienia i przekroczenia granicy stężenia toksycznego w pobliżu komórek.

Jiang i in. [42] elektroprzędli lek z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych ibuprofen. Jako matrycy polimerowej użyli biokompatybilnego kopolimeru PLGA oraz mieszaniny polimerów PLGA i PEG-g-chitozanu. Zauważono, że materiał PLGA z ibuprofenem skurczył się po zanurzeniu w roztworze PBS (bufor fosforanowy) (37°C) do około 20% swojej początkowej wielkości. Dodatek PEG-g-chitozanu do PLGA sprawił, że materiał pochłonął wodę uniemożliwiając kompresję. Materiał zawierający ibuprofen (5% wag.) rozpuszczony w matrycy PLGA uwolnił całą dawkę leku w przeciągu 12 dni, z czego 85% w 4 dni. Zmieszanie PEG-g-chitozanu z PLGA w stosunku 30:70, znacząco zmniejszyło szybkość uwalniania osiągając 70% uwolnionego leku w 16 dni.

Zeng i in. badali uwalnianie rifampiny (lek przeciwgruźliczy) [43] oraz paklitakselu (leku przeciwnowotworowego) [44] z włókien poli(L-laktydu) PLLA w obecności enzymu proteinyazy K. W obu przypadkach leki rozpuszczono w roztworze PLLA (3,9 % wag.) w mieszaninie chloroform/aceton (2:1 obj.). Dodatkowo do roztworu rifampiny (15% wag. wzgl. polimeru) dodano surfaktant: kationowy (5% wag. chlorku trietyloamoniowego), anionowy (5% wag. dodecylosulfonianu sodowego) oraz niejonowy (5% wag. PEO-PPO) (PPO - poli(tlenek propylenu)). Dodatek chlorku trietyloamoniowego spowodował największy spadek grubości i polidispersyjności włókien w porównaniu do włókien bez surfaktantu. Nie zaobserwowano uwalniania rifampiny bez udziału enzymu hydrolizującego

polimerowy materiał. Dodatkowo proteiny K spowodowało liniowe uwolnienie 50% początkowej dawki leku w czasie 7 godzin. Jednakowy przebieg profilu uzyskano dla paklitakselu (15% wag. wzgl. polimeru) uwalnianego w obecności enzymu, gdzie 100% leku uwolniono w czasie 55 godzin.

Wspomniany lek przeciwnowotworowy elektroprzędzono również z 30% wag. roztworu PLGA w dichlorometanie/N,N-dimetyloformamidzie (70:30) [45]. Sporządzone materiały badano *in vitro* i wykazano stopniowe uwalnianie paklitakselu przez 80 dni, co według autorów stanowi istotną przewagę nad konwencjonalnym podawaniem leku. Dodatkowo materiały zbadano na modelu zwierzęcym i dowiedziono zmniejszenia guza po 24 i 32 dniach od implantacji w porównaniu do grupy kontrolnej bez materiału i po podaniu systemowym Taxolu®.

Kenawy i in. [46] wykonali materiały z nanowłókien i płaskiego filmu uwalniające ketoprofen. W tym celu sporządzili trzy roztwory: biodegradowalnego poli(kaprolaktonu) PCL (10% wag.), niebiodegradowalnego poliuretanu PU (10%) oraz mieszaniny 25:75 PCL/PU (10% wag.) w chloroformie. Do każdego z roztworów dodano ketoprofen rozpuszczony w metanolu uzyskując roztwory o stężeniu 5% wag. względem polimeru. Każdy z materiałów charakteryzował się dużym wyrzutem leku wynoszącym od 20% w przypadku uwalniania z filmu PCL do 80% dla nanowłókien PCL i PU. W większości przypadków, po początkowym wyrzucie leku, zaobserwowano stopniowy wzrost uwalnianego leku osiągając 100% uwolnionej dawki w przypadku nanowłókien PCL i PU. Proces uwalniania przeprowadzano w dwóch temperaturach 20°C i 37°C. Dla temperatury 37°C uzyskano wyższy końcowy procent uwolnienia leku.

Uwalnianie antybiotyków: chlorowodorku tetracykliny, chlorotetracykliny oraz amfoterycyny B z włókien PCL i PLA poli(laktydu) badała grupa Buschle-Diller [47]. Roztwory polimerów (9-15% wag.) z lekiem o stężeniu 2% wag. (1% wag. w przypadku amfoterycyny B) elektroprzędzono z roztworu chloroformu i uzyskano porowate nanowłókna. Materiały wykonane z PCL uwolniły około 40%-50% chlorowodorku tetracykliny w przeciągu pierwszych kilku godzin, osiągając po 170 minutach 90% uwolnienia początkowej masy leku. Włóknina z PLA w tym samym czasie zatrzymała około 90% leku w nanowłóknach. Uwalnianie leku z mieszaniny PCL/PLA wyglądało identycznie jak w przypadku omówionego uwalniania z PCL i PLA w zależności od dominującego udziału jednego z polimerów.

1.3.2. Nanowłókna typu rdzeń – osnowa

Enkapsulacja leków w rdzeniu nanowłókna poprzez otoczenie warstwą polimeru bez leku pozwala na zmniejszenie ryzyka wystąpienia wyrzutu składnika aktywnego. Proces ten wykonuje się przy użyciu koncentrycznych dysz do których doprowadzone są elektroprzędzone roztwory (*core-shell*). Stosunek promienia rdzenia do promienia osnowy można regulować przez zmianę przepływu roztworów. Dzięki tej technice możliwe jest wprowadzanie do nanowłókien zarówno leków lipofilowych jak i hydrofilowych, pozwalając zachować aktywność leku przez dłuższy czas. Uwalnianie leków z włókien typu rdzeń – osnowa, przebiega głównie przez nanopory osnowy i może być regulowane przez dodanie małocząsteczkowych polimerów, które po szybkim wypłukaniu z osnowy ułatwiają dyfuzyjny transport leków.

Wu i in. [27] elektroprzędli nanowłókna zawierające w rdzeniu antyoksydanty: witaminę E (5% wag. w stos. do polimeru) oraz stabilną pochodną witaminy C (0,5% wag. w stos. do polimeru), rozpuszczone w mieszaninie N,N-dimetyloacetamidu i wody (5:1). Osnowę nanowłókna stanowił roztwór poli(akrylonitrylu) PAN (6%-10% wag.) w N,N-dimetyloacetamidzie. Pierwszym przeprowadzonym eksperymentem było wyprzędzenie mieszaniny obu antyoksydantów w roztworze polimeru i sprawdzenie morfologii włókien dla różnych stężeń polimeru. Zauważono wzrost liczby defektów w postaci kropel na włóknach dla elektroprzędzenia roztworu o stężeniu 6% wag. PAN oraz elektroprzędzenia typu rdzeń – osnowa o tym samym stężeniu roztworu polimeru w osnowie. Profile uwalniania witamin E i C z nanowłókien typu rdzeń – osnowa i nanowłókien powstałych z mieszaniny roztworu polimeru i witamin były jednakowe. Materiał rdzeń – osnowa charakteryzował się brakiem wyrzutu leków i stopniowym (zbliżonym do liniowego) uwalnianiem witamin osiągając około 70% całkowicie uwolnionej masy po 175 godzinach. Drugi materiał uwolnił około 40% leku przez pierwsze 6 godzin, zaś 75% leku po 175 godzinach.

Jednoczesne uwalnianie dwóch składników z włókna rdzeń – osnowa było przedmiotem zainteresowania Su i in. [48]. Badacze przeanalizowali wpływ wielkości cząsteczek uwalnianych składników na szybkość uwalniania z poszczególnych struktur nanowłókna. W tym celu wykorzystali czynnik fluorescencyjny Rodaminę B i albuminę surowicy wołowej BSA (składnik będący substytutem leków białkowych). Analogi leków uwalniano z 4,7% wag. roztworu poli(L-laktydu-co-kaprolaktanu) PLC w heksafluoro-2-propanolu jako osnowie. Wyniki uwalniania z materiału zawierającego wodny roztwór

białka BSA w rdzeniu i Rodaminę B w osnowie pokazały 20% wyrzut białka i 63% wyrzut Rodaminy B. Dalsze uwalnianie białka przebiegało stopniowo osiągając po 800 godzinach 50% uwolnienia, zaś w przypadku Rodaminy B uwolniono 80% w czasie 200 godzin bez wyraźnego wzrostu uwolnionej masy do 800 godzin. Zamiana rozmieszczenia analogów leku w poszczególnych strukturach dała podobne profile uwalniania. Profil uwalniania białka BSA z osnowy był podobny do profilu Rodaminy B umieszczonej w osnowie z różnicą widoczną w wysokości wyrzutu leku, zmniejszoną o 10 punktów procentowych. Rodamina B z rdzenia uwalniała się stopniowo, osiągając 40% uwolnienia po 800 godzinach.

Srikanth i in. [49] badali uwalnianie Rodaminy 610 (0,138% wag. wzgl. polimeru) z polimerowego rdzenia poli(metakrylanu metylu) PMMA (15% lub 24% wag. polimeru w mieszaninie N,N-dimetyloformamid/acetone 60:40) przez osnowę z polimeru PCL (12% wag. polimeru w N,N-dimetyloformamidzie). Średnica otrzymanych włókien wynosiła około 4000 nm, zaś średnica rdzenia od 400 do 1000 nm. W obu przypadkach (materiały różniły się stężeniem PMMA w rdzeniu) uwalnianie barwnika przebiegało podobnie. Zaobserwowano brak wyrzutu rodaminy oraz stopniowe, trwające 550 godzin uwalnianie 20% początkowej masy barwnika.

Wang i in. [50] przebadali uwalnianie leku dimetylooksoalliloglicyny, (DMOG, stosowanego jako czynnik proangiogeny, imitujący hipoksję poprzez hamowanie aktywności hydroksylaz prolinowych). Najlepszy profil uwalniania leku (20% wyrzut leku i dalsze liniowe uwalnianie przez 30 dni) uzyskali dzięki zastosowaniu w rdzeniu polimeru poli(DL-laktydu) PDLLA elektroprzędzonego z N,N-dimetyloformamidem, zaś jako osnowę nanowłókna polimeru poli(hydroksymaślanu) PHB elektroprzędzonego z chloroformem. Stosując polimer PHB jako osnowę włókna i lek w rdzeniu PDLLA, uzyskano 30% wyrzut leku i stopniowe uwalnianie do poziomu 70% początkowej ilości leku.

Wytwarzane są również włókna o większej liczbie warstw otaczających rdzeń nanowłókna [51]. Han i in. elektroprzędli nanowłókna z rdzenia polimeru poli(winylo piroolidonu) PVP w wodzie z dwoma osnowami z polimeru PCL rozpuszczonego w mieszaninie chloroform/trifluoroetanol (pierwsza osnowa) oraz trifluoroetanolu (druga osnowa). Materiały uwalniały dwa związki fluorescencyjne (pochodne ksantenu): Keyacid™ Blue (rdzeń), Keyacin™ Uranine (zewnątrzna osnowa). Otrzymane materiały uwalniały barwnik z rdzenia przez dwie warstwy osnowy około 24 razy wolniej niż z rdzenia materiału wykonanego techniką rdzenia w osnowie. Uwolnienie całej dawki barwnika

z zewnętrznej osnowy trwało około 25-50 godzin, jednakże zauważalny był bardzo duży wyrzut składnika wynoszący 70-90% początkowej masy barwnika dostępnej we włóknie. Uwalnianie barwnika z rdzenia nanowłókna rozpoczęło się 20-40% uwolnieniem leku i dalszym stopniowym uwolnieniem 100% początkowej masy barwnika w przeciągu 50 godzin. Ten typ materiału wg autorów oferuje szerokie możliwości doboru polimerów i mieszanin rozpuszczalników, dzięki czemu osiągalna jest pełna kontrola nad uwalnianiem leków.

Umieszczenie warstwy materiału z lekiem pomiędzy dwoma warstwami bez leku pozwala na zmniejszenie szybkości uwalniania składnika [52]–[54]. Kim i in. [53], [54] elektroprzędli zewnętrzne warstwy materiału z polimeru PCL rozpuszczonego w mieszaninie dichlorometan/N,N-dimetyloformamid. Warstwę wewnętrzną stanowił hydrofilowy PEO z rodaminą (w każdym materiale grubość warstwy z barwnikiem była taka sama). Wytworzenie materiałów wielowarstwowych polegało na elektroprzędzeniu kolejnych warstw polimerów: PCL, PEO z rodaminą, PCL. Grubość warstw zewnętrznych regulowano przez zwiększenie/zmniejszenie czasu elektroprzędzenia. Materiał o całkowitej grubości 68,5 μm charakteryzował się 60% wyrzutem barwnika i dalszym liniowym uwalnianiem, osiągając 90% po 20 dniach uwalniania. Materiały o grubości 176 μm oraz 242 μm w pierwszych sześciu godzinach uwolniły odpowiednio 20% i 8% barwnika. Zaobserwowano liniowy przebieg uwalniania do poziomu 40% i 20% dla materiałów o grubości odpowiednio 176 μm oraz 242 μm . Wg autorów liniowa zależność uwalniania w funkcji grubości materiałów może być wytłumaczona przez wzrost oporów przepływu wody absorbującej barwnik przez materiał o większej grubości.

1.3.3. Nanowłókna z elektroprzędzenia emulsji

Wprowadzenie leków hydrofilowych z lipofilowych roztworów polimerów umożliwia elektroprzędzenie emulsji typu woda w oleju. W przypadku przędzenia leków wrażliwych na obecność rozpuszczalników organicznych lub surfaktantów, korzystniejsze jest zastosowanie metody typu rdzeń – osnowa. W metodzie tej do roztworu polimeru dodawany jest środek powierzchniowo czynny, a następnie wkraplana jest faza wodna. Podczas mieszania i/lub stosowania ultradźwięków wymiar kropeł fazy wodnej ulega zmniejszeniu do rozmiaru kilku lub kilkuset mikrometrów. Ważnym aspektem jest dobór odpowiedniego surfaktantu stabilizującego emulsję, który nie doprowadzi do separacji faz podczas elektroprzędzenia. W trakcie procesu tworzenia włókien kropełki fazy wodnej mogą

równomiernie zdyspergować w nanowłóknie, umiejscowić się blisko powierzchni nanowłókien lub w przypadku stosunkowo lepkiej fazy wodnej, możliwe jest uzyskanie struktury typu rdzeń w osnowie. Innym parametrem wpływającym na morfologię włókien i uwalnianie leków jest stosunek faz wodnej do olejowej. Im większy udział fazy wodnej tym mniej jednorodne otrzymywano włókna oraz tym chętniej się one sklejały [55].

Tian i in. [56] wytworzyli materiały zawierające czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*Vascular Endothelial Growth Factor VEGF*). Emulsję wykonano przez zmieszanie roztworu polimeru PLC (8% wag./obj. chloroformu) z surfaktantem SPAN-80 i zakroplenie fazy wodnej (stosunek fazy wodnej do organicznej 1:20) zawierającej 1 μg czynnika VEGF i 5% wag. białka BSA lub dekstran. Roztwory mieszano przez dobę, uzyskując jednorodną emulsję. Szybkość uwalniania z materiału zawierającego BSA lub dekstran była jednakowa. Materiał z BSA wyrzucił w początkowej fazie eksperymentu 10% początkowej masy czynnika VEGF, osiągając po 672 godzinach uwalniania 21% uwolnionej masy. Materiał z dekstranem w fazie wodnej charakteryzował się liniową kinetyką uwalniając 13% czynnika wzrostu. Różnice w szybkości uwalniania badacze argumentowali zmianą lepkości rdzenia a tym samym jego średnicy.

Uwalniany czynnik wzrostu NGF (*Nerve Growth Factor*) z nanowłókien polimeru PLC w obecności białka BSA, zachował swoją aktywność biochemiczną i zdolność do różnicowania komórek linii PC12 [57]. Nanowłókna przygotowano przez rozpuszczenie polimeru w dichlorometanie (6% wag.), dodanie 40 mg surfaktantu SPAN-80 i wkroplenie (z jednoczesnym mieszaniem) fazy wodnej zawierającej NGF i BSA. Oszacowanie uwolnienia białka NGF wykonano metodą pośrednią poprzez oznaczenie uwolnionego BSA. Szybkość uwalniania białka BSA z nanowłókien wykonanych metodą elektroprzędzenia emulsji po początkowym wyrzucie białka rzędu 20%, była stała. Po 12 dniach uwolniono około 65% białka zawartego w materiale. Wynik porównano z materiałem wykonanym techniką elektroprzędzenia zawiesiny BSA w roztworze polimeru. Materiał uwolnił 60% białka w pierwszych kilku godzinach od rozpoczęcia uwalniania, zaś po 12 dniach uwolnił 70% BSA. Zauważono, że dodatek BSA nieznacznie wpłynął na grubość otrzymywanych nanowłókien.

Ten sam czynnik wzrostu uwalniano z nanowłókien kopolimeru PCL z EEP (fosforan etylu) (12% wag.) rozpuszczonego w dichlorometanie [58]. Również w tym przypadku wykorzystano białko BSA do stabilizacji NGF. Podczas elektroprzędzenia zauważono koalescencję fazy wodnej w kropli pod dyszą, skutkującą oderwaniem kropli

polimeru z zamkniętą fazą wodną. Średnica otrzymanych włókien wynosiła około 5 μm . W pierwszych godzinach uwalniania materiał opuściło 20% NGF zaś po 95 dniach uwolniono całą dawkę czynnika wzrostu. Aby ocenić w jakiej formie zamknięto czynnik wzrostu we włóknie, podczas przygotowania emulsji dodano niewielką ilość białka BSA sprzężonego z FITC (izotiocyjanian fluoresceiny). Zdjęcia mikroskopii konfokalnej wykazały obecność dużych kropeł we włóknie.

Maretschek i in. [59] przebadali uwalnianie hydrofilowego białka cytochromu C z hydrofobowego materiału z nanowłókien PLLA rozpuszczonego w chloroformie (1-3% wag. względem polimeru). Materiały wykazywały liniową charakterystykę uwalniania i jednocześnie zauważono, że szybkość uwalniania białka malała wraz ze wzrostem stężenia polimeru. Badacze zaobserwowali znaczny wzrost uwalnianego składnika po dodaniu surfaktantu do płynu z analizowanymi materiałami. Według autorów większość cytochromu C znalazła się na powierzchni nanowłókien w postaci kryształów i zmniejszenie hydrofobowości materiału skutkowało jednorazowym wyrzutem dużej dawki białka. Szybkość uwalniania białka regulowano przez zmniejszenie hydrofobowości materiału, dzięki dodaniu do fazy wodnej hydrofilowych polimerów: poli(L-lizyny) oraz poli(etylenoiminy). Dodatek polimerów przyspieszył uwalnianie białka oraz wpłynęła na wzrost grubości włókien w materiale.

1.4. Charakterystyczne parametry materiałów z nanowłókien wpływające na szybkość uwalniania leków

W niniejszej części przedstawiono najważniejsze parametry elektroprzędzonego materiału, mające wpływ na przebieg uwalniania leków. Liczba czynników mających wpływ na szybkość uwalniania jest znaczna, dlatego autor skoncentrował uwagę na parametrach dokładnie opisanych w literaturze oraz tych które analizowano eksperymentalnie w niniejszej pracy.

1.4.1. Skład nanowłókien

Najważniejszym parametrem determinującym szybkość uwalniania leku z nanowłókien jest typ użytego polimeru. Oddziaływania pomiędzy polimerem a lekiem pełnią zasadniczą rolę w procesie desorpcji leku z powierzchni nanowłókien. Jednocześnie czas i sposób degradacji polimeru może wpłynąć na szybkość uwalniania leków. Peng i in. [60] zaobserwowali, że polimer PLC w większości przypadków degradujący objętościowo (degradacja zachodzi w całym materiale jednocześnie, prowadząc do rozkładu łańcuchów

na mniejsze fragmenty), zastosowany jako opatrunek na oku, wykazał powierzchniowy typ erozji (utrata masy materiału przez hydrolizę wierzchniej części materiału). Wybór lotnego (nisko wrzącego) rozpuszczalnika jest kluczowy dla tworzenia nanoporów we włóknie, które znacząco zwiększają powierzchnię właściwą materiału przyspieszając uwalnianie leku. W przedstawionych pracach założono, całkowite odparowanie rozpuszczalnika w trakcie elektroprzędzenia, zaś powstałe polimerowe nanowłókna zawierają wyłącznie lek lub jego analog i dodatkowe nietlone składniki (surfaktant, polimerowe roztwory rdzenia w strukturze rdzeń-osnowa).

Srikar i in. [49] badali szybkość uwalniania Rodaminy 610 (substancja fluorescencyjna) z roztworów różnych polimerów. Nanowłókna z PCL przygotowano z roztworów o stężeniu 11%, 13%, 15% wag. w mieszaninie dichlorometanu/N,N-dimetyloformamidu (40:60). Stężenie składnika fluorescencyjnego w każdym roztworze polimeru było jednakowe i wynosiło 0,25% wag. względem polimeru. Profile uwalniania Rodaminy 610 z nanowłókien PCL wykazały dużą zależność ilości uwolnionej substancji od stężenia polimeru w roztworze. Materiały o coraz wyższym stężeniu polimeru w roztworze, charakteryzowały się coraz niższym wyrzutem leku i niższą wartością uwolnionej substancji. Po 50 godzinach dla materiałów powstałych z roztworów o stężeniach polimeru: 11%, 13%, 15% poziom uwalniania osiągnięto na odpowiednio: 67%, 50% i 31% początkowej dawki. Autorzy stwierdzili, że wraz ze wzrostem stężenia polimeru w roztworze i tym samym lepkości roztworu, zahamowany zostaje proces powstawania nanoporowatości w nanowłóknie i tym samym zmniejszeniu ulega powierzchnia wymiany masy. Z danych na temat grubości nanowłókien można zauważyć, że wraz ze wzrostem stężenia polimeru PCL (11, 13, 15%) rosła również grubość otrzymywanych włókien, odpowiednio 500, 650 i 700 nm. Czynnikiem ten mógł się również przyczynić do zmniejszenia ilości uwolnionej substancji. Wyniki po kolejnych 170 godzinach nie wykazały dalszego uwalniania Rodaminy 610 z materiałów. Nanowłókna z polimeru PMMA o różnych masach molowych: 120, 350, 996 kDa rozpuszczonych w N,N-dimetyloformamidzie, przygotowano ze stężenia odpowiednio: 24%, 15%, 15%. Wzrost stężenia dla PMMA o masie molowej 120 kDa podyktowany był koniecznością zwiększenia lepkości roztworu. Z uwagi na niską szybkość uwalniania z polimeru PMMA, stężenie Rodaminy 610 wynosiło około 3% wag. względem polimeru. Dla żadnego z materiałów nie zauważono wyrzutu, jednakże po około 200 godzinach szybkość uwalniania zwiększyła się, co mogło być spowodowane spęcznieniem zewnętrznej warstwy

polimeru i powiększeniem porów z których uwalniana była substancja. Uwalnianie z nanowłókien PMMA o niższej masie molowej (120kDa) było znacznie szybsze w porównaniu do uwalniania z nanowłókien PMMA o wyższej masie molowej. Po 1400 godzinach eksperymentu, ułamek uwolnionej substancji wynosił 1,4% (120kDa), 0,7% (350kDa) oraz 0,5% (996 kDa). Zaobserwowaną różnicę w szybkości uwalniania z nanowłókien PMMA i PCL o zbliżonych masach molowych, autorzy tłumaczą większą energią wiązania cząsteczki leku z cząsteczką PMMA. Kontrolę uwalniania z nanowłókien zrealizowano przez zmieszanie obu polimerów. W pracy wykazano, że procesem ograniczającym szybkość uwalniania substancji jest desorpcja z powierzchni nanowłókien. Różnice w poziomach uwolnionego fluorochromu dla obu polimerów i ich stężeń w roztworze wynikały z różnic w otrzymanych powierzchniach wymiany masy poszczególnych materiałów oraz różnych wiązaniach pomiędzy rodaminą a polimerem.

Jednakową obserwację dotyczącą spadku szybkości uwalniania leków ze wzrostem stężenia polimeru PLLA w roztworze (5, 8, 10% wag.) dla włókien typu rdzeń – osnowa poczynił He i in. [61]. Polimer PLLA rozpuszczono w mieszaninie chloroform/aceton (2:1) oraz dodano niewielką ilość czynnika sieciującego izocyjanuranu triallilowego (TAIC). W rdzeniu enkapsulowano chlorowoderek tetracykliny (5% wag.) rozpuszczony w mieszaninie metanol/chloroform (2:1) z dodatkiem PLLA (1% wag.). Badacze uzyskali materiały o stałej szybkości uwalniania przez 30 dni z najniższą szybkością dla materiału o najwyższym stężeniu polimeru. Zaobserwowano, że nanowłókna wyprzędzone z roztworu o niższym stężeniu PLLA były bardziej jednorodne i miały mniejszy rozrzut grubości włókien.

1.4.2. Rozmiar nanowłókien

Parametrem decydującym o skali procesu dyfuzji jest droga jaką musi pokonać składnik aktywny aby przejść do płynu wypełniającego pory materiału. Wzrost grubości włókien powoduje spadek stosunku powierzchni właściwej do objętości nanowłókien. Wskutek zmniejszenia powierzchni wymiany masy, szybkości uwalniania z mikrowłókien jest znacznie mniejsza niż z nanowłókien. Rozmiar włókien jest również ściśle powiązany z szybkością hydrolitycznej degradacji nanowłókien [62]. Włókna o mniejszej średnicy degradują szybciej, powodując całkowite uwolnienie leku w krótszym czasie [63]. Zwiększenie grubości nanowłókien można kontrolować przez podniesienie objętościowego

natężenia przepływu roztworu polimeru, zmniejszenie napięcia przyłożonego do dyszy lub podniesienie lepkości elektroprzędzonego roztworu polimeru.

Cui i in. [64] wytworzyli nanowłókna z roztworu PDLLA rozpuszczonego w mieszaninie aceton/chloroform 3:1. Różnorodny rozmiar nanowłókien otrzymano przez wyprzędzenie roztworów o stężeniu polimeru wynoszącym 18, 23, 30%, otrzymując nanowłókna o średnim rozmiarze odpowiednio: 211, 550 i 1309 nm. Zawartość paracetanolu w każdym z materiałów wynosiła 5% wag. Paracetanol uwalniano do roztworu PBS z 0,02% zawartością azydku sodu, utrzymywanego w temperaturze 37°C i stale mieszanego. Metodą odparowania rozpuszczalnika wytworzono film polimerowy zawierający taką samą ilość paracetanolu jak we włóknach. Grubość filmu wynosiła 100µm. Włókna o średnicy 212 nm uwolniły całą dawkę leku w przeciągu pierwszych 50 godzin. Grubsze włókna również wykazały początkowy wyrzut leku, jednakże w przypadku włókien o średnicy 551 nm uwalnianie leku po czasie 25 godzin, zakończyło się na poziomie 50%. Dalszy stopniowy proces uwalniania, po 350 godzinach doprowadził do uwolnienia 80% początkowej dawki leku. Najgrubsze włókna o średnicy 1310 nm przez 100 godzin uwalniały lek ze stałą szybkością do poziomu 82%. Po tym czasie znacząco spadła szybkość uwalniania leku, prowadząc do uwolnienia 83% po 350 godzinach prowadzenia eksperymentu. Materiał polimerowy o grubości 100µm przez pierwsze 6 godzin uwolnił 38% dawki leku, prowadząc do uwolnienia 40% po 350 godzinach. Dalsze uwolnienie pozostałej zawartości leku z materiałów możliwe będzie na drodze degradacji polimeru.

Badania nad wpływem rozmiaru włókien elektroprzędzonych z emulsji PCLEEP (12% wag. w dichlorometanie) i uwalnianie czynnika wzrostu NGF z dodatkiem białka BSA było przedmiotem badań Chew i in. [58]. Emulsja zawierająca NGF i BSA była przędzona ze zwiększonym przepływem roztworu polimeru przez dyszę (8,5 ml/h) w rezultacie otrzymano włókna o średnicy 2,8 µm. Materiał przez pierwsze 6 godzin uwolnił 20% zawartości czynnika wzrostu. Po tym czasie przez 90 dni obserwowano bliski liniowemu wzrost uwalniania NGF do poziomu 90%.

Wpływ rozmiaru nanowłókien na szybkość uwalniania 5-fluorouracylu badała grupa Chen i in. [65]. Uwalnianie prowadzono z nanowłókien PLA elektroprzędzonych z mieszaniny chloroform/N,N-dimetyloformamid (PLA 10% wag.) oraz hexafluoro-2-propanol/ N,N-dimetyloformamid (PLA 15% wag.). Stężenie 5-fluorouracylu wynosiło w każdym przypadku 3% wag. względem polimeru. Różną grubość nanowłókien uzyskano dzięki zmianie objętościowego natężenia przepływu roztworu polimeru z dyszy oraz

zmianie rozpuszczalnika. Dla każdego z czterech materiałów osiągnięto podobny początkowy wyrzut leku wynoszący 20%. Dalsze uwalnianie 5-fluorouracylu przebiegało z różną szybkością, zależną od grubości włókien. Po około 75 godzinach eksperymentu materiały uwalniały lek z jednakową szybkością. Materiał o najgrubszych włóknach 1020 nm (PLA 10%, Q = 0,5 ml/h) charakteryzował się najmniejszą szybkością uwalniania. Po około 350 dniach uwolnił około 53% początkowej ilości leku. Materiały o grubości włókien 730 nm (PLA 10%, Q = 0,3 ml/h), 530 nm (PLA 15%, Q = 0,5 ml/h) oraz 350 nm (PLA 15%, Q = 0,3 ml/h), po tym samym czasie uwolniły odpowiednio 55, 60 i 65% początkowej dawki leku. W przypadku włókien elektroprzędzonych z mieszaniny rozpuszczalników hexafluoro-2-propanol/N,N-dimetyloformamid zaobserwowano metodą mikroskopii elektronowej obecność kryształów na powierzchni nanowłókien. Szybko rozpuszczony 5-fluorouracyl w formie kryształów mógł przyczynić się do zaobserwowania dużego wyrzutu leku z tych materiałów.

Ranganath i in. [45] uwalniali paklitaksel jako czynnik wspomagający w pooperacyjnej chemioterapii. W tym celu wykorzystali polimer PLGA (85:15 i 50:50, $M_w = 40-75$ kDa) rozpuszczony w mieszaninie dichlorometan/N,N-dimetyloformamid odpowiednio 70:30 i 80:20. Roztwór polimeru o stężeniu 30% wag./obj. wymieszano z paklitakselem otrzymując stężenie 8,9% wag. Mikrowłókna o średnicy 3,5 μm wykonano z roztworu PLGA (85:15) (DCM/DMF 80:20) ustanawiając przepływ polimeru przez dyszę na poziomie 6 ml/h. Nanowłókna o średnicy 930 nm wykonano z roztworu polimeru PLGA (50:50) (DCM/DFM 70:30) ustanawiając przepływ polimeru przez dyszę na poziomie 0,3 ml/h. Dodatkowo, materiały przebadano z dwóch różnych formułacji materiałów: trzech połączonych dysków o średnicy 1mm i płaskich opatrunków. Cieńszy materiał w postaci opatrunku o włóknach średnicy 930 nm, charakteryzował się 7,5% wyrzutem leku i dużą szybkością uwalniania do 9 dnia eksperymentu. Po tym czasie materiał uwalniał paklitaksel ze stałą szybkością, osiągając 45% uwolnionej masy po 80 dniach. Ten sam materiał w postaci spasowanego dysku uwolnił ze stałą szybkością 35% leku przez 80 dni. Materiał z włóknami o grubości 3,5 μm , uwalniany w postaci płaskiego opatrunku uwolnił 10% leku w przeciągu 8 dni, a następnie ze stałą szybkością uwolnił 15% przez 72 dni. Materiał w postaci spasowanych dysków przez cały czas trwania eksperymentu uwalniał lek ze stałą szybkością, osiągając 25% ubytku leku. Materiały badano *in vivo* na małym modelu zwierzęcym. Wyniki zmniejszenia objętości guza dzięki zastosowaniu materiałów z nano-

i mikrowłókien porównano z komercyjnie dostępnym roztworem paklitakselu Taxol® oraz placebo.

1.4.3. Porowatość materiału i nanoporowatość włókien

Związana z rozmiarem włókien porowatość materiału, ma istotny wpływ na szybkość uwalniania leków. Wzrost odległości pomiędzy włóknami umożliwia większy dostęp wody, przyspieszając uwalnianie. W literaturze obserwowana jest zależność mówiąca, iż wraz ze spadkiem średniej grubości nanowłókien, wzrasta porowatość materiału i maleje średnia wielkość porów [66]–[68]. Jedną z metod zwiększenia porowatości materiału jest jednoczesne przędzenie dwóch strug polimeru, jedną z lekiem drugą zaś z małocząsteczkowym polimerem, który wymywa się odpowiednim rozpuszczalnikiem [66]. W badaniach wielu autorów zauważalne jest skupienie uwagi na zwiększeniu porowatości umożliwiając zasiedlenie materiału z nanowłókien przez komórki [68], [69]. Odnotowano nieliczne prace analizujące wpływ porowatości materiału na proces uwalniania leków [47], [65]. Sirc i in. [70] zauważyli, że uwalnianie z materiałów o niższej porowatości (większej grubości włókien) jest znacznie wolniejsze niż w przypadku materiałów bardziej porowatych. Według autorów jest to spowodowane utrudnionym transportem leku w porach materiału spowodowanym zwiększoną obecnością włókien. Jednocześnie autorzy poczynili uwagę dotyczącą metod pomiaru grubości mat z nanowłókien. Według badaczy, grubość materiałów powinna być mierzona w takich samych warunkach w jakich będzie on stosowany (np. w stanie nasiąknięcia wodą). Pomiar grubości materiałów ze zdjęć mikroskopii SEM może dać zafałszowane wyniki nt. porowatości materiału oraz rozkładu wielkości porów z uwagi na próżnię i w konsekwencji brak wody w porach. Srikar i in. [49] zaobserwowali wzrost ilości uwolnionej substancji ze wzrostem porowatości materiału. Według autorów jest to spowodowane zwiększoną penetracją nanoporów przez wodę i ułatwieniem desorpcji leku z powierzchni nanowłókien. Inną istotną kwestią jest nanoporowatość nanowłókien. Badania powierzchni włókien za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego przedstawiają bardzo duże rozwinięcie powierzchni właściwej włókien. Jednym z procesów prowadzących do powstania nanoporów jest nukleacja i wzrost pęcherzyków rozpuszczalnika oraz dalsze penetrowanie zastygającej matrycy polimerowej [49]. Opór transportu powstających pęcherzyków stawiany jest przez lepkość roztworu. Większe stężenie lub masa molowa użytego polimeru prowadzi do powstania większych oporów i tym samym nanoporowatość powinna być mniejsza. Druga metoda polega na

do dodaniu do roztworu polimeru małowcząsteczkowego polimeru np. PEO, który tuż po kontakcie z wodą rozpuszcza się tworząc pory. Wymienione metody zwiększania nanoporowatości pozwalają na uwolnienie całej dawki leku w czasie od kilkudziesięciu minut do kilkudziesięciu dni [47], [71], [72].

Srouji i in. [71] badali uwalnianie z włókien typu rdzeń osnowa. W rdzeniu nanowłókna enkapsulowano rekombinowane białko morfogenetyczne kości (*BMP-2 Bone Morphogenic Protein 2*), jednocześnie zwiększono lepkość rdzenia przez dodanie PEO 4% wag. ($M_w = 600$ kDa). Osnowę włókna tworzył polimer PCL 9% wag. z dodatkiem PEG 2,1-3,0% ($M_w = 6$ kDa) elektroprzędzony z mieszaniny chloroform/DMF 9:1. Obrazy mikroskopii elektronowej wykazały wyraźny wzrost ilości i wielkości porów wraz ze wzrostem ilości porofora. Nanowłókna zawierające 2,1% i 2,4% porofora w osnowie, po 27 dniach uwolniły odpowiednio 10% i 13% białka. Materiał zawierający 2,7% porofora ostatecznie uwolnił 26% BMP-2 wykazując po około 12 dniach wyraźne spowolnienie uwalniania. W przypadku materiału o największej zawartości porofora zaobserwowano 60% wyrzut leku oraz zatrzymanie uwalniania białka po 14 dniach na poziomie 75%. Omawiane materiały badano *in vivo* na małym modelu zwierzęcym z modelowym uszkodzeniem kości czaszki. Przy użyciu mikro-tomografii komputerowej zaobserwowano dwukrotny wzrost powierzchni nowo tworzonej kości w porównaniu do materiału nie zawierającego białka. Wg autorów wyniki przedstawionych badań wskazują na możliwość kontrolowania uwalniania przez zmianę nanoporowatości nanowłókien. Jednocześnie podkreślono znaczący wpływ desorpcji leku z porów nanowłókien na szybkość uwalniania.

Song i in. [72] enkapsulowali porowate nanocząstki ditlenku krzemu zawierające Rodaminę B, w nanowłóknach PLGA. Nanowłókna przygotowano przez zdyspergowanie różnej ilości nanocząstek z Rodaminą B (5, 15, 25% w stosunku do PLGA) w mieszaninie N,N-dimetyloformamid/tetrahydrofuran (3:1). Następnie w mieszaninie rozpuszczono PLGA (27% wag./obj.) i dodano fluoresceinę (5% wag. w stosunku do PLGA). Powstały system z dwoma czynnikami fluorescencyjnymi badano w roztworze PBS pod kątem uwalniania. Obrazy mikroskopii elektronowej i transmisyjnej wykazały znaczny wzrost ilości nanocząstek przy powierzchni nanowłókien wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek. Wyniki uwalniania fluoresceiny z nanowłókien PLGA o stężeniu nanocząstek 0-25% (w stos. do PLGA) wykazały niewielką zależność od stężenia nanocząstek. W każdym przypadku materiały uwolniły około 40-50% dawki fluoresceiny w przeciągu pierwszych 6 godzin. Dalsze stopniowe uwalnianie doprowadziło do uwolnienia około 80-85%

fluoresceiny po 13 dniach. Uwalnianie Rodaminy z samych nanocząstek charakteryzowało się 50% wyrzutem leku i stopniowym uwolnieniem przez 13 dni 80% barwnika. Nanowłókna zawierające 5% nanocząstek cechowały się najwolniejszym uwalnianiem Rodaminy B z włókien osiągając po 13 dniach 8% całkowitego ubytku barwnika. Nanowłókna zawierające 15 i 25% nanocząstek uwolniły bez początkowego wyrzutu odpowiednio 18 i 35% rodaminy. W materiałach po uwalnianiu zaobserwowano metodą mikroskopii elektronowej znaczny wzrost nanoporów we włóknach, jednakże nie zaobserwowano znaczącego wzrostu porów ze wzrostem stężenia nanocząstek we włóknach.

1.4.4. Hydrofobowość materiału

Dodanie środka powierzchniowo czynnego do roztworu polimeru lub płynu w którym uwalniany jest lek znacząco przyspiesza transport wody do powierzchni nanowłókien i w konsekwencji desorpcję leku. Pomiar hydrofobowości materiału przeprowadza się metodą goniometryczną. W tym badaniu wykonuje się pomiar kąta zwilżania kropli umieszczonej na badanych materiałach z nanowłókien jak również polimerowych filmach, powstałych przez odparowanie rozpuszczalnika z roztworu. Obecność powietrza w porach materiałów z nanowłókien czyni materiał super-hydrofobowym, a wartość kąta zwilżania takich materiałów wynosi do 140°.

Maretschek i in. [59] badali uwalnianie Cytochromu C z nanowłókien PLLA do buforu PBS oraz do buforu zawierającego od 0,001% do 0,01% Tween 20. Zauważono, że po dodaniu niewielkiej ilości surfaktantu do buforu, materiał gwałtownie wyrzuca lek. Obserwowane zjawisko wytłumaczono obecnością większości Cytochromu C na powierzchni włókien.

Zastosowanie w roztworze polimeru jonowych surfaktantów zwiększa przewodnictwo roztworu powodując zmniejszenie rozmiaru nanowłókien. W miejsce środków powierzchniowo czynnych zwiększających hydrofilowość materiału, stosowane są hydrofilowe polimery. Do hydrofobowego polimeru PLLA dodano polimery hydrofilowe PEI lub PLL [59] i zaobserwowano uwolnienie całej zawartości białka w przeciągu 10 godzin po zmieszaniu PEI z PLLA w stosunku 1:1. Zmieszanie polimeru PLL z PLLA w stosunku 1:1 spowodowało zwiększenie wyrzutu leku i tym samym trzykrotny wzrost uwolnionej dawki. Dodatek naturalnego składnika macierzy zewnątrzkomórkowej - kolagenu we włóknach PLGA spowodował wzrost hydrofilowości materiału [73]. W tym celu opracowano materiał warstwowy z włóknami PLGA/kolagen na wierzchnich częściach

materiału i nanowłóknami z trzema antybiotykami w wewnętrznej warstwie materiału. Dodatek kolagenu miał za zadanie zwiększyć biokompatybilność rusztowania dla komórek odbudowujących zainfekowaną ranę. W przypadku uwalniania każdego z leków: wankomycyny, gentamycyny, lidokainy nie zauważono znacznych różnic pomiędzy materiałami o różnych grubościach warstwy zewnętrznej. Stężenie uwalnianych substancji znacząco przewyższało minimalne stężenie inhibicji przez czas około 4 tygodni.

Xu i in. [74] zaproponowali kontrolę uwalniania przez zmianę nano i mikro struktury włókien na powierzchni polimerowego filmu zawierającego paracetamol (10% wag.) lub 5-fluorouracyl (2,5% wag.). Różne pokrycia z nanowłókien poli(winylopirolidonu) PVB generowano przez zmianę gęstości (czasu przędzenia) i wzoru włókien na powierzchni filmu z polimeru PVB. Zmiana gęstości i aranżacji nanowłókien dała możliwość kontroli hydrofobowości materiału w zakresie od 80° do 153° . Szybkość uwalniania leków z filmu PVB uległa zmniejszeniu wraz ze wzrostem gęstości nanowłókien na powierzchni. Materiał bez nanowłókien (kąąt zwilżania $83,2^\circ$) uwolnił stopniowo około 72% paracetamolu w czasie 10 dni. Materiał z nanowłóknami przędzonymi przez godzinę (kąąt zwilżania $145,4^\circ$) uwolnił w tym samym czasie 45%. Identyczną zależność zaobserwowano dla 5-fluorouracylu, gdzie ostatecznie uwolniona po 10 dniach masa spadła z 41 do 25%.

1.4.5. Ukierunkowanie nanowłókien

W ostatnich dwóch latach ukazały się pierwsze prace w których badano wpływ ukierunkowania nanowłókien na uwalnianie leków. Ukierunkowanie i wynikająca z tego niewielka odległość pomiędzy nanowłóknami hamuje dyfuzję w porach materiału. Uporządkowanie nanowłókien w określonym kierunku realizowane jest przy użyciu szybkoobrotowego bębna lub talerza jako kolektora. Ukierunkowane włókna otrzymywano głównie na potrzeby inżynierii tkankowej, badając zachowanie komórek nerwowych, śródbłonna lub miotubul mięśnia szkieletowego [75]–[77]. Stopień ukierunkowania nanowłókien można określić na podstawie zdjęć mikroskopii elektronowej lub konfokalnej przy użyciu programów obróbki obrazów np. ImageJ (NIH, USA) [78]. Materiały o ukierunkowanych, ściśle do siebie przylegających włóknach charakteryzują się mniejszą porowatością. Blisko ułożone włókna oddziałują na siebie zmniejszając gradient stężenia w porach materiału. Dodatkowo pozostaje mniej przestrzeni dla penetrującej materiał wody.

Meng i in. [77] uwalniali z włókien PLGA i PLGA/żelatyna (9:1) fenbufen (lek z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych). Dla porównania wyprodukowali metodą

odparowania rozpuszczalnika film polimerowy. PDLG (LA/GA 85/15, $M_w = 200$ kDa) rozpuszczono w 2,2,2,-trifluoroetanolu, dodano fenbufen otrzymując w rezultacie stężenie 0,2% wag. względem polimeru. Włókna ukierunkowano zbierając na walec obrotowy o średnicy 50 mm, obracający się z prędkością 3000 obr./min. Otrzymane nanowłókna uwalniano w roztworze PBS w 37°C. Włókna zawierające żelatynę, z powodu większej hydrofilowości uwolniły całą dawkę leku w przeciągu 25 godzin. Włókna PLGA oraz film polimerowy zawierający żelatynę, w tym samym czasie uwolniły około 52% leku. Materiały o ukierunkowanej strukturze włókien uwalniały lek nieco wolniej niż nanowłókna ułożone przypadkowo. Materiał z dodatkiem żelatyny do 15 godziny eksperymentu, uwalniał o 5 pkt. procentowych mniej fenbufenu niż materiał o przypadkowo ułożonych włóknach. Ukierunkowane włókna PLGA od 7 godziny eksperymentu uwalniały z mniejszą szybkością osiągając po 25 godzinach 45% całkowitej uwolnionej masy, w porównaniu do 52% uwolnionych z włókien ułożonych przypadkowo.

Dla celów inżynierii tkankowej uwalniano kwas retinowy z ukierunkowanych oraz ułożonych przypadkowo nanowłókien PCL [79]. Polimer PCL ($M_w = 45$ kDa) rozpuszczono w mieszaninie dichlorometan/metanol (8:2) otrzymując stężenie 10% wag./obj. Do roztworu polimeru dodano następnie roztwór kwasu retinowego w metanolu, otrzymując w efekcie roztwory o stężeniu leku równym: 0,1; 0,2; 0,3% wag. Materiały uwalniano w roztworze PBS w 37°C. Nanowłókna z lekiem (0,2% wag.) ułożone w sposób przypadkowy, uwolniły po 29 dniach około 17% początkowej dawki leku. Materiał nie wykazał niekorzystnego początkowego wyrzutu leku. Materiał o takim samym składzie, o włóknach ułożonych równolegle uwolnił około 7,5% leku. Również nie zaobserwowano początkowego wyrzutu, a profil uwalniania miał postać liniowo zależną od czasu. Zdjęcia mikroskopii elektronowej materiałów po uwalnianiu nie wykazały żadnych zmian w morfologii nanowłókien.

1.5. Modele uwalniania leków

Niewątpliwe korzyści terapii opartej na systemach kontrolowanego uwalniania leków oraz znaczący postęp w dziedzinie technologii informatycznych, skłoniły badaczy do sięgnięcia po możliwości projektowania i optymalizacji stosowanych w takich systemach materiałów metodami komputerowymi (*in silico*). W roku 1961 ukazała się praca Higuchiego [80] prezentująca najczęściej obecnie wykorzystywane równanie do opisu uwalniania leków z płaskich, litych materiałów. W późniejszym czasie wprowadzono wiele

modyfikacji biorących pod uwagę porowatość materiału jak również inne geometrie. Odtąd powstające modele matematyczne uwzględniające wiele ważnych aspektów transportu leków stały się podstawowym narzędziem w projektowaniu systemów uwalniania leków. W roku 1981 Langer i Peppas przedstawili usystematyzowany przegląd rodzajów systemów uwalniania w rozróżnieniu na mechanizmy limitujące transport składnika [80]. Systemy uwalniania podzielono na kontrolowane przez: dyfuzję (w samym materiale oraz przez membranę), degradację nośnika, pęcznienie materiału oraz cechy środowiskowe (zmiana pH lub temperatury). Pełna lista parametrów, które należy przeanalizować podczas poszukiwań potencjalnego mechanizmu lub mechanizmów kontrolujących uwolnienie leku jest znacznie większa [81].

Z punktu widzenia uwalniania leku z nanowłókien istotna jest analiza:

- zwilżalności materiału,
- szybkości penetracji ośrodka (wody) w materiale,
- tworzenia porów w momencie kontaktu z wodą,
- tworzenia pęknięć materiału podczas uwalniania,
- współczynnika dyfuzji którego wartość może zmieniać się w czasie i być zależna od kierunku uwalniania,
- ewentualnego wystąpienia konwekcji (naturalnego lub wymuszonego mieszania) w ośrodku,
- wielu innych specyficznych aspektów związanych z procesami chemicznymi i fizycznymi w samym materiale.

Z uwagi na złożoność zjawisk, liczne efekty sprzężone oraz często brak precyzyjnych danych fizyko-chemicznych charakteryzujących konkretny system uwalniania leku, kompleksowa analiza wszystkich czynników wpływających na dynamikę procesu uwalniania leku jest często niemożliwa. Mimo to, nawet uproszczone modele matematyczne dają możliwość oszacowania czasowych zmian stężenia uwalnianego leku w materiale, a w przypadku bardziej skomplikowanych modeli także przestrzenne zmiany stężenia. Umożliwia to prześledzenie transportu leku, określenie mechanizmów limitujących szybkość uwalniania, a następnie postulowanie zmian koniecznych do zoptymalizowania tego procesu. Analiza parametryczna materiału pod kątem geometrii, początkowego stężenia leku a także współczynników transportu w konkretnych tkankach pozwala zoptymalizować materiał do określonego zastosowania. Prognozowanie szybkości uwalniania substancji

aktywnej z systemów podawania leków oszczędza koszty oraz czas przeprowadzanych eksperymentów.

1.5.1. Modele empiryczne i pół-empiryczne

Matematyczne modele empiryczne i pół empiryczne oferują najprostsze i najszybsze podejście do opisu uwalniania leków. W wielu przypadkach nie uwzględniają zjawisk fizycznych i chemicznych zachodzących podczas uwalniania z matrycy polimerowej. Nie nadają się wobec tego do analizy ilościowej uwalniania z systemów o różnych parametrach materiałowych (stężeniu początkowym leku, porowatości materiału). Równania te powstały w oparciu o ściśle określone założenia, które powinny być zweryfikowane dla konkretnych poddanych analizie przypadków. Z modeli empirycznych najczęściej korzysta się podczas analizy porównawczej profili uwalniania dla pojedynczego parametru np. stałej szybkości uwalniania. Ze względu na swoją prostotę mogą pomóc wstępnie określić mechanizm uwalniania. Zdolność szacowania szybkości uwalniania z użyciem tego typu modeli jest stosunkowo niska.

W najprostszym przypadku, proces uwalniania leku można opisać kinetyką zerowego lub pierwszego rzędu. Kinetyką zerowego rzędu przedstawiano różnorodne systemy uwalniające lek ze stałą szybkością, na przykład uwalnianie leku przeciwnowotworowego karmustyny z polimerowych waflí Gliadel® [82]–[84]. W tym przypadku istotna była obserwacja proporcjonalności szybkości erozji materiału do powierzchni uwalniania. Zainspirowało to Langera [85] do badań nad nowymi polimerami z grupy bezwodników. W przypadku tych polimerów erozja waflí była procesem kontrolującym uwalnianie stałej ilości leku przeciwnowotworowego w czasie. Masa uwolniona z materiału po czasie t , ze stałą szybkości zerowego rzędu k , może być wtedy przedstawiona prostym równaniem:

$$M_t = kt \quad (1.1)$$

Kinetyką pierwszego rzędu opisywane są procesy, których szybkość zależy od stężenia uwalnianej substancji obecnej w materiale. Stałą proporcjonalności jest stała szybkości pierwszego rzędu k , zaś M_∞ to całkowita masa substancji obecna w materiale. Zmodyfikowane równanie kinetyki pierwszego rzędu przedstawiające ułamek uwolnionej masy można wyrazić równaniem:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-kt) \quad (1.2)$$

Najczęściej stosowanym modelem jest zaproponowane przez Peppasa [86] równanie uwalniania substancji, które w ogólnej postaci można przedstawić wzorem:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (1.3)$$

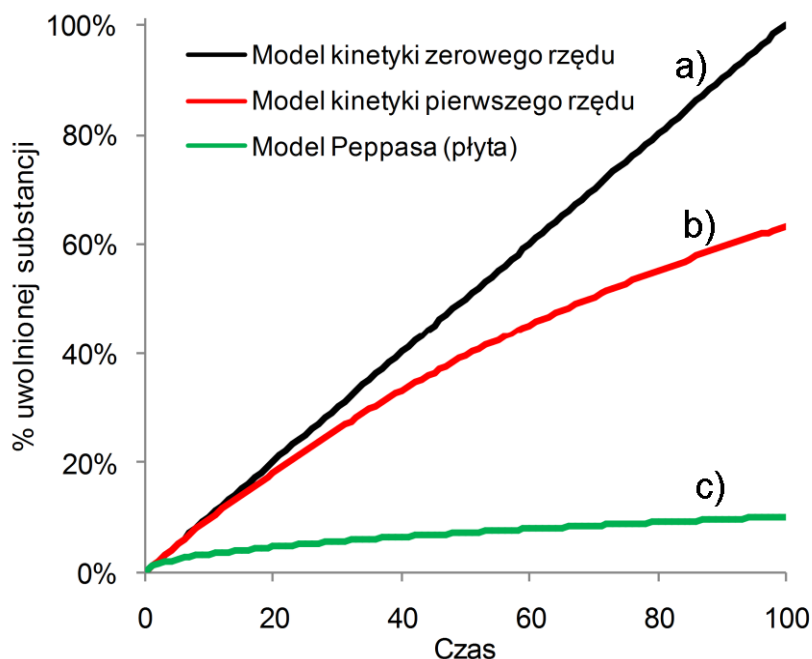
W zależności od mechanizmu uwalniania jak i geometrii nośnika określone zostały różne wartości wykładnika n . Wartości zaprezentowano w tabeli nr 1.1. Parametr k jest stałą uwzględniającą strukturę nośnika zawierającego lek. Termin dyfuzja anomalna odnosi się do sytuacji w której mechanizm uwalniania jest kombinacją dyfuzji oraz pęcznienia polimeru.

Tab. 1.1. Wykładnik n w modelu Peppasa (1.3) wyznaczony dla różnych geometrii i mechanizmów uwalniania [87].

Wykładnik n			Mechanizm uwalniania
Płyta	Cylinder	Sfera	
0,5	0,45	0,43	Dyfuzja Ficka
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Dyfuzja anomalna
1,0	0,89	0,85	Pęcznienie polimeru

Porównanie wyżej wymienionych modeli przy założeniu tej samej wartości stałej szybkości uwalniania ($k = 1 \cdot 10^{-2}$) oraz zastosowaniu wykładnika potęgi $n = 0,5$ w modelu Peppasa przedstawiono na rysunku 1.6. Zauważalna jest zmiana szybkości uwalniania w przypadku modeli kinetyki zerowego i pierwszego rzędu. W początkowej fazie szybkości te są jednakowe, jednakże wraz ze spadkiem stężenia substancji w materiale szybkość uwalniania maleje w przypadku modelu kinetyki pierwszorzędowej. Model Peppasa dla tej samej wartości parametru k , wykazuje zdecydowanie mniejszy stopień uwolnienia.

Na bazie przedstawionych modeli powstało wiele modyfikacji uwzględniających różne parametry geometryczne nośnika dla konkretnych mechanizmów uwalniania. W tej grupie można wymienić model Cooneya [88] jak również Hopfenberga [89]. Z uwagi na prostotę, modele te znalazły również szerokie zastosowanie w modelowaniu uwalniania leków z nanowłókien [50], [90]–[94].



Rys. 1.6. Porównanie modeli doświadczalnych o kinetyce zerowego a) i pierwszego rzędu b) oraz modelu Peppasa c). W obliczeniach założono jednakową stałą szybkości uwalniania wynoszącą $k = 1 \cdot 10^{-2}$ dla każdego z modeli. Obliczenia własne.

Omawiane modele charakteryzuje szereg poważnych ograniczeń. Pierwszym założeniem przy modelowaniu dyfuzji opisanej prawem Ficka jest stężenie leku w materiale, które musi być mniejsze od stężenia nasycenia. Dodatkowe założenia dotyczą braku efektów brzegowych, stałego współczynnika dyfuzji oraz braku efektów pęcznienia i rozpuszczania/degradacji materiału.

1.5.2. Modele mechanistyczne

Modele oparte na analizie zjawisk fizycznych związanych z procesem uwolnienia leku, biorące pod uwagę m.in. dokładną geometrię nośnika można określić mianem modeli mechanistycznych. Podstawowymi równaniami opisującymi uwalnianie leku są pierwsze i drugie prawo Ficka. Oprócz transportu molekularnego, można wyróżnić inne zjawiska kontrolujące proces uwalniania: konwekcję w otaczającym płynie, pęcznienie nośnika, desorpcję leku z powierzchni nośnika, formę rozmieszczenia leku w nośniku i wiele innych.

Ważnym modelem wyprowadzonym dla układu transdermalnego z możliwością zastosowania w innych systemach uwalniania, jest równanie Higuchiego [95]. Równanie wyprowadzono z równania Ficka wykorzystując odpowiednie warunki brzegowe i uproszczenia:

- etapem limitującym jest transport w materiale, podczas gdy transport przez skórę jest natychmiastowy i można przyjąć warunek zerowego stężenia na granicy ze skórą (*perfect sink conditions*),
- początkowe stężenie leku w materiale znacząco przekracza granicę rozpuszczalności leku w materiale,
- równomierne rozmieszczenie kryształków leku w materiale,
- rozpuszczenie leku w materiale jest nieskończenie szybkie w porównaniu do transportu dyfuzyjnego,
- stała wartość współczynnika dyfuzji,
- brak efektów brzegowych,
- nośnik leku nie pęcznieje oraz nie degraduje podczas uwalniania.

Wystawiony na kontakt ze skórą rozpuszczony lek, dyfunduje z warstwy najbliższej skórze zaś spadek stężenia jest natychmiastowo uzupełniany przez rozpuszczenie leku z kryształków. Stężenie rozpuszczonego leku w materiale pozostaje stałe tak długo jak długo obecny jest lek w postaci kryształów. Higuchi wyprowadził swoje równanie dla warunków pseudo ustalonych, co jest prawdziwe dla układów zawierających duży nadmiar leku. Późniejsze zmiany wprowadzone przez autora umożliwiły obliczenie uwolnionej masy z innych układów o różnej geometrii. Uwolniona masa leku M_t w czasie t z płaskiej płyty (filmu polimerowego) wyrażona jest równaniem:

$$\frac{M_t}{A_t} = \sqrt{D(2C_0 - C_s)C_s t} \quad (1.4)$$

gdzie: M_t - kumulatywna masa uwolnionego leku, A_t - powierzchnia kontaktu materiału ze skórą, C_0 - stężenie początkowe leku, C_s - stężenie nasycenia, D - współczynnik dyfuzji.

Podobnie jak w przypadku równania Peppasa, również równanie Higuchiego jest często błędnie wykorzystane w literaturze do opisu uwalniania leków z nanowłókien [87]. Wynika to głównie z niespełnienia założeń przedstawionych modeli np. konieczności wprowadzenia leku do matrycy w formie nasyconej. W użytym równaniu Peppasa, z dopasowania modelu (dla systemu uwalniania w postaci płyty) do danych eksperymentalnych autorzy [90] otrzymali wartości wykładnika n poniżej granicznej wartości 0,5, co nie mieści się w założeniach modelu (patrz. Tabela 1.1.).

Chociaż transport dyfuzyjny często pełni decydującą rolę w procesie uwalniania leków, występują też inne mechanizmy wpływające na ogólny opis transportu leku. Taki

rozszerzony opis przedstawiają poniższe równania wyprowadzone przy następujących założeniach [96]:

- transport dyfuzyjny jest najwolniejszym procesem transportu składnika,
- współczynnik dyfuzji jest stały,
- w otoczeniu materiału występują warunki doskonałego wymieszania, gdzie stężenie składnika w płynie jest równe zero,
- materiał z którego zbudowany jest nośnik nie pęcznieje w czasie uwalniania lub pęcznieje stosunkowo szybko osiągając stan równowagi,
- materiał z którego zbudowany jest nośnik nie eroduje,
- opór transportu masy wynikający z powstania niemieszanej warstewki granicznej jest do pominięcia.

W przypadku systemów kontrolowanych wyłącznie przez dyfuzję zmianę stężenia w czasie opisuje drugie prawo Ficka [97]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) \quad (1.5)$$

gdzie: C - stężenie leku, D - współczynnik dyfuzji, x, y, z - współrzędne.

Geometria systemu uwalniania leków ma znaczący wpływ na kinetykę uwalniania. Rozwiązanie równania (1.5) dla materiału w kształcie płaskiej płyty (filmu polimerowego) z początkowym stężeniem leku poniżej stężenia nasycenia, można przedstawić w postaci równania [97]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{D(2n+1)^2\pi^2 t}{L^2}\right) \quad (1.6)$$

gdzie: M_t - kumulatywna masa uwolnionego leku, M_∞ - całkowita masa zamknięta w materiale, L - grubość polimerowego filmu, D - współczynnik dyfuzji, t - czas.

W przypadku uwalniania z nośnika w kształcie cylindra (uwzględniony radialny i osiowy transport leku), równanie uwalniania ma postać [98]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{32}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{q_n^2} \exp\left(-\frac{q_n^2}{R^2} Dt\right) \times \sum_{p=0}^{\infty} \frac{1}{(2p+1)^2} \exp\left(-\frac{(2p+1)^2\pi^2}{H^2} Dt\right) \quad (1.7)$$

gdzie: q_n - pierwiastek funkcji Bessela pierwszego rzędu [$J_0(q_n) = 0$], R - promień cylindra, H - długość cylindra.

W zależności od budowy nośnika rozróżnia się tu dwa typy systemów uwalniania: homogeniczny (monolityczny), gdzie lek rozpuszczony jest w całej objętości nośnika oraz otoczony membraną w którym lek znajdujący się w rdzeniu dyfunduje przez osnowę kontrolującą szybkość procesu. Uwalnianie z płaskich polimerowych filmów osłoniętych przepuszczalną dla leku membraną, zwanych również materiałami z rezerwuarem leku (*reservoir system*), z lekiem o stężeniu mniejszym od stężenia nasycenia można przedstawić równaniem [96]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp\left(-\frac{ADKt}{VL}\right) \quad (1.8)$$

gdzie: A - całkowita powierzchnia polimerowego filmu, D - współczynnik dyfuzji, K - współczynnik podziału masy leku pomiędzy rezerwuarem a polimerową membraną, L - grubość membrany, V - objętość rezerwuaru.

Uwalnianie z rdzenia materiału w kształcie cylindra otoczonego membraną (osnową) można przedstawić równaniem [96]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp\left[-\frac{(R_1H + R_0H + 2R_1R_0)DKt}{R_1^2H(R_0 - R_1)}\right] \quad (1.9)$$

gdzie: R_1 - promień rdzenia, R_0 - promień całkowity włókna, H - długość włókna.

Powyższe równania wyprowadzono w oparciu o założenie stałej wartości współczynnika dyfuzji leku w materiale. Często obserwowana jest zależność współczynnika od położenia np. podczas erozji czy też pęcznienia materiału. Dla takich przypadków brak jest analitycznych rozwiązań, a proces uwolnienia leku określa się stosując metody numeryczne.

Pęcznienie nośnika leku może być jedynym mechanizmem kontrolującym szybkość procesu uwalniania. W momencie kontaktu z płynem, penetruje on nośnik doprowadzając do jego spęcznienia. Wzrasta droga dyfuzji cząsteczek leku przemieszczających się z nośnika do otaczającego płynu, zaś zmniejszeniu ulega siła napędowa procesu transportu. Wzrasta jednakże ruchliwość cząsteczek w napęczniałym nośniku zwiększając szybkość uwalniania substancji. Modelowanie systemów uwalniania, gdzie głównym mechanizmem limitującym szybkość uwalniania jest pęcznienie materiału można przeprowadzić z użyciem

równań kinetyki uwalniania zerowego lub pierwszego rzędu zaproponowanych przez Peppasa [81].

Innymi mechanizmami kontrolującymi uwalnianie mogą być degradacja lub ogólniej erozja materiału. Degradacja matrycy polimerowej polega na rozpadzie łańcuchów polimeru na mniejsze fragmenty: oligomery i monomery. Erozja materiału to proces utraty masy z matrycy, opisywany szerzej aniżeli degradacja łańcucha polimeru. Może to być rozpad materiału na mniejsze fragmenty, a także degradacja łańcuchów polimerów do monomerów. Wyróżnia się dwa typy erozji materiału: powierzchniowy oraz objętościowy. Erozja powierzchniowa występuje kiedy penetracja wody w głąb materiału jest znacznie wolniejsza od rozpadu łańcuchów polimeru na mniejsze odcinki. W rezultacie następuje degradacja wierzchniej części materiału otoczonej płynem. W przypadku gdy penetracja wody jest znacznie szybsza niż rozpad łańcuchów polimeru na fragmenty, mamy do czynienia z erozją objętościową występującą w całej matrycy polimerowej. Najprostszym równaniem do opisu erozji powierzchniowej jest wyrażenie przez kinetykę pierwszorzędową, jednakże z uwagi na przypadkowość procesu, stworzono modele oparte na metodzie Monte Carlo. Metoda ta została połączona z dyfuzyjnym transportem składnika z polimerowych nośników. Otrzymany model porównano z danymi doświadczalnymi uzyskując bardzo dobrą zgodność profili uwalniania [81].

Model mechanistyczny procesu desorpcji leków z powierzchni porów nanowłókien przedstawił Srikar i in. [49]. Większość modeli przyjmuje dyfuzję jako limitujący etap uwalniania leku, co powinno w każdym przypadku doprowadzić do całkowitego uwolnienia leku w określonym czasie. Autorzy sugerują iż uwalnianie leku nie zależy od dyfuzji w matrycy polimerowej, która jest bardzo wolna, lecz od desorpcji z porów obecnych w nanowłóknach i powierzchni zewnętrznej włókien. Z powyższych założeń wynika, że uwięziony w matrycy polimerowej lek może być uwolniony jedynie na drodze degradacji polimeru, która w przypadku dwutygodniowej skali czasowej nie jest obserwowana. Model uwalniania z porów nanowłókien zakłada, że efektywny współczynnik dyfuzji D_{eff} w nanoporze jest znacznie mniejszy od współczynnika dyfuzji D w wodzie przez co pole stężenia leku w nanoporze jest pseudo stacjonarne. Dla nanowłókien uwolnienie leku z powierzchni nanoporów można określić równaniem [49]:

$$\frac{G_t}{M_{d0}} = \alpha \left[1 - \exp\left(-\frac{\pi^2 t}{8 \tau_r}\right) \right] \quad (1.10)$$

gdzie: G_t - masa uwolniona po czasie t , M_{d0} - całkowita początkowa masa leku, α - współczynnik nanoporowatości, zależny od stężenia polimeru i jego masy molowej, $\tau_r = L^2/D_{eff}$ gdzie L to długość nanopora. Charakterystyczny czas uwalniania z nanowłókien τ_r zależy od parametrów procesu desorpcji charakteryzujących międzycząsteczkowe wiązanie cząsteczek leku do polimeru w obecności wody. Stąd też parametr ten powinien zależeć jedynie od chemicznej natury oddziaływań cząsteczki leku z polimerem odpowiedzialnej za proces adsorpcji - desorpcji na powierzchni nanowłókien.

W przypadku tworzenia się mikropęknięć ułatwiających uwolnienie leku lub pojawiania się nowych nanoporów na skutek wymywania małowieliczynowego polimeru, proces uwalniania leku można opisać przez superpozycję dwóch równań desorpcji (1.10) [28]. Wyróżnić można dwa parametry nanoporowatości oraz charakterystycznego czasu desorpcji. Pierwszy parametr nanoporowatości odpowiedzialny jest za pory powstałe w czasie elektroprzędzenia nanowłókien, drugi zaś za pory i mikropęknięcia powstałe podczas uwalniania leku z materiału [28]:

$$\frac{G_t}{M_{d0}} = \alpha_1 \left[1 - \exp\left(-\frac{\pi^2 t}{8 \tau_{r1}}\right) \right] + \alpha_2 \left[1 - \exp\left(-\frac{\pi^2 t}{8 \tau_{r2}}\right) \right] \quad (1.11)$$

Dwustopniowy model desorpcji zastosowano w [28] do oceny uwalniania rodaminy B i ryboflawiny z niedegradowalnego polimeru PET i mieszaniny biodegradowalnego białka sojowego z poliamidem (nylon 6) zawierających małowieliczynowy polimer PEG. W odróżnieniu od relatywnie wolnego procesu elektroprzędzenia, w tym przypadku zastosowano technikę wydmuchu nanowłókien z roztworu polimeru.

Model oddziaływania pomiędzy lekiem a matrycą nośnika leku zaproponował Zeng i in. [99], [100]. Trójparametrowy model uwzględniający odwracalne wiązanie lek-nośnik i pierwszorzędową kinetykę uwalniania wyprowadzono dla przypadku uwalniania z liposomów. Analityczne rozwiązanie układu równań zastosowano następnie dla innych nośników: nanokapsułek, nanocząstek, nanowłókien monolitycznych i typu rdzeń - osnowa. Przedstawiony model może posłużyć analizie wpływu składu i formy nanonośnika (masy molowej polimeru, układu rdzeń osnowa, obecności kryształów leku) jak również własności materiału (wielkości nanoporów, hydrofobowości) oraz impulsów zewnętrznych (zmiana pH, temperatury). Rozwiązanie układu równań różniczkowych dla odpowiednich warunków początkowych i brzegowych można przedstawić w postaci równania kumulatywnego uwolnienia leku [99], [100]:

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{\lambda_2(k_s - \lambda_2)}{(k_{on} + k_{off})(\lambda_1 - \lambda_2)} [1 - \exp(-\lambda_1 t)] + \frac{\lambda_1(\lambda_1 - k_s)}{(k_{on} + k_{off})(\lambda_1 - \lambda_2)} [1 - \exp(-\lambda_2 t)] \quad (1.12)$$

gdzie: M_t - masa leku uwolniona w czasie t , M_0 - całkowita masa leku w nośniku, $\lambda_{1,2} = [k_s + k_{on} + k_{off} \pm \sqrt{(k_s + k_{on} + k_{off})^2 - 4k_s k_{off}}]/2$ to wartości własne rozwiązywanego układu równań, k_s - stała proporcjonalności, k_{on} - współczynnik przyłączania leku do powierzchni nośnika, k_{off} - współczynnik odłączania leku od powierzchni nośnika.

Dla przypadku kiedy współczynnik odłączenia (desorpcji) leku od nośnika jest znacznie większy niż współczynnik przyłączenia (adsorpcji) wtedy większość leku znajduje się w postaci niezwiązanej z polimerem i etapem najwolniejszym jest transport dyfuzyjny i konwekcyjny. Równanie (1.12) można wtedy uprościć do postaci równania kinetyki pierwszego rzędu [99], [100]:

$$\frac{M_t}{M_0} = [1 - \exp(-k_s t)] \quad (1.13)$$

Jeśli etapem limitującym uwalnianie leku jest desorpcja i adsorpcja leku na powierzchni nośnika wtedy [99], [100]:

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{k_{off}}{(k_{on} + k_{off})} [1 - \exp(-k_s t)] + \frac{k_{on}}{(k_{on} + k_{off})} [1 - \exp(-k_{off} t)] \quad (1.14)$$

Autorzy [99], [100] wykorzystali powyższe równania do analizy 60 profili uwalniania z 16 typów nośników leków. Dopasowanie modelu do profili uwalniania leków przeprowadzono dla nanowłókien PLLA z doksorubicyną oraz nanowłókien PLC i PCL-hydrożel z białkiem BSA. Niecałkowite dopasowanie otrzymano wyłącznie dla nanowłókien PCL-hydrożel, gdzie po czasie 20 dni od rozpoczęcia uwalniania nastąpił wzrost szybkości uwalniania spowodowany degradacją hydrożelu.

1.5.3. Modele numeryczne

Skomplikowana struktura systemów uwalniania leków wymaga wykorzystania obliczeń numerycznych dla układów równań cząstkowych opisujących transport masy. Najczęściej modele te wykorzystywano w rozważaniach nad uwalnianiem leków z porowatych tabletek, których geometria nie pozwalała na zastosowanie rozwiązań analitycznych. Tzafiri [101] skorzystał z metody elementów skończonych do opisu

uwalniania z degradującej matrycy. Katalizowany enzymatycznie hydrolytyczny rozpad polimeru opisano z wykorzystaniem kinetyki Michaelisa-Mentena. Założenie odwracalnego wiązania leku z powierzchnią nośnika było stosowane w modelach uwalniania leków ze stentów pokrytych polimerowym nośnikiem z lekiem [102], hydrożelu [103], [104], oraz włókien [105].

Różniczkowy bilans masy w cieczy można przedstawić równaniem:

$$\frac{\partial C_B}{\partial t} \varepsilon + \nabla \cdot (\vec{u} C_B) \varepsilon = \nabla \cdot (D \nabla C_B) \varepsilon - \frac{\partial C_A}{\partial t} (1 - \varepsilon) \rho_p - R_B \quad (1.15)$$

gdzie: C_B - stężenie leku w płynie, ε - porowatość materiału, \vec{u} - prędkość płynu, D - współczynnik dyfuzji leku w płynie, C_A - stężenie leku w nośniku polimerowym, ρ_p - gęstość właściwa matrycy polimerowej, R_B - szybkość zaniku leku na skutek reakcji biochemicznej (eliminacja leku).

Zmiana stężenia leku w matrycy polimerowej opisana jest równaniem:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = k_{ads} (C_A^{max} - C_A) \cdot C_B - k_{des} C_A \quad (1.16)$$

Przytoczony powyżej model sorpcji i transportu substancji w materiale porowatym można zaadaptować do konkretnych przypadków uwalniania leków, dobierając odpowiednio do rozważanego przypadku i zadanej geometrii układu warunki początkowe i brzegowe. Przedstawiony model wykorzystano w dalszej części pracy do opisu uwalniania substancji z nanowłókien.

1.6. Los leku w ustroju

Po podaniu leku w organizmie zachodzi szereg procesów, które można uszeregować w trzy podstawowe fazy: farmaceutyczną, farmakokinetyczną oraz farmakodynamiczną [3]. W pierwszej fazie, z punktu widzenia niniejszej pracy najistotniejszej, analizie poddawane jest zjawisko uwalniania substancji leczniczej do postaci gotowej do wchłonięcia do krwioobiegu lub tkanek. Na szybkość i stopień uwolnienia substancji aktywnej ma wpływ wiele czynników. W ogólności szybkość uwalniania zależy od postaci leku i dla przypadku nanowłókien polimerowych, czynniki wpływające na uwolnienie substancji aktywnej przedstawiono w rozdziale 1.3. Z pierwszą fazą uwalniania związany jest termin dostępności farmaceutycznej leku, określający mierzoną w warunkach laboratoryjnych ilość uwolnionej substancji aktywnej w stosunku do całkowitej dawki tej substancji.

W kolejnej fazie następuje szereg następujących po sobie procesów: wchłanianie, dystrybucja, metabolizm i wydalanie leku z organizmu. Wchłanianie substancji aktywnej polega na przejściu leku od miejsca podania do krwioobiegu i w przypadku ogólnoustrojowego podania leku, wymaga przejścia leku przez błony biologiczne. Szybkość tego procesu zależy m.in. od właściwości fizykochemicznych leku. Dzięki otrzymanym wynikom z przeprowadzonych badań laboratoryjnych dotyczących szybkości uwalniania i wchłaniania można obliczyć dostępność biologiczną, czyli ilość substancji aktywnej jaka z podanej dawki dostała się do krwioobiegu. Podstawowym parametrem opisującym farmakokinetykę leku jest AUC (*area under the curve*) stanowiący wartość pola powierzchni pod krzywą stężenia leku w osoczu. Dodatkowymi parametrami kinetycznymi jest stężenie maksymalne i czas po jakim zostało ono osiągnięte. Kolejnym procesem jest dystrybucja leku w organizmie poprzez transport z krwią i osoczem do miejsca działania leku. Z uwagi na różną ilość i szybkość przepływu krwi przez poszczególne tkanki, rozmieszczenie leku w organizmie może być nierównomierne. Etapem towarzyszącym może być magazynowanie leku. Pierwszorzędnym celem organizmu po podaniu leku jest wydalenie go z ustroju. Metabolizm leku przebiega głównie w wątrobie, w której zachodzą reakcje enzymatyczne prowadzące do zmian w działaniu leku: przekształcenia do postaci toksycznej, przekształcenia z postaci nieaktywnej do aktywnej (podawanie proleku) lub dezaktywacji leku i jego usunięcia. Metabolizm większości leków składa się z dwóch etapów. W pierwszym etapie dochodzi do utlenienia (cytochromy CYP 450), redukcji, dealkilacji lub hydrolizy leku, służącym przygotowaniu substancji do etapu drugiego. W kolejnym etapie enzymy sprzęgające pomagają wytworzyć z substancji metabolizowanej łatwo rozpuszczalne w wodzie koniugaty eliminowane przez nerki. Ważnym z punktu widzenia farmakologii terminem jest czas półtrwania leku w organizmie, wyrażony jako czas po którym stężenie leku we krwi spadnie o połowę. Dzięki jego wartości można określić czy zmiana we własnościach leku spowodowała zmianę w jego dystrybucji i eliminacji z organizmu.

W fazie farmakodynamicznej opisywany jest molekularny mechanizm działania leku czyli jego wpływ na funkcjonowanie komórek i tkanek. Celem molekularnym działania leków może być działanie specyficzne lub niespecyficzne na receptory błonowe, kanały jonowe umieszczone w błonach, kwasy nukleinowe czy też enzymy katalizujące metabolizm. Istotnym elementem tej fazy jest również określenie molekularnych podstaw efektów toksycznych towarzyszących terapii. W fazie farmakodynamicznej obserwowana

jest odpowiedź farmakologiczna na podany lek. Przy spełnieniu pewnych założeń, odpowiedź farmakologiczna może być wykorzystana do pomiaru dostępności biologicznej tam, gdzie nie ma możliwości określenia stężenia produktu leczniczego.

Ważnym aspektem z punktu widzenia badań klinicznych jest korelacja uwalniania w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Idealnym rozwiązaniem jest opracowanie metody eksperymentalnej symulującej warunki panujące w żywym organizmie. Korelacja na poziomie „A” to relacja punkt do punktu pomiędzy wskaźnikami (np. profilami uwalniania leku w czasie) w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Pokrywanie się profili uwalniania daje liniową korelację, dzięki czemu stosując metody konwolucji z danych *in vitro* można przewidzieć stężenie leku w osoczu, pole powierzchni pod krzywą AUC czy też stężenie maksymalne. W przypadku systemów uwalniania leków działających miejscowo, standardowe metody określania korelacji są odpowiednio modyfikowane.

1.7. Podanie leków do mózgu

Głównym celem obecnej pracy jest stworzenie aktywnych opatrunków dla ośrodkowego układu nerwowego. Dostarczenie leków do ośrodkowego układu nerwowego (*central nervous system*) na drodze ogólnoustrojowego podania jest zadaniem trudnym z uwagi na obecność bariery krew-mózg. Jedynie leki małocząsteczkowe, rozpuszczalne w tłuszczach i niektóre białka mogą swobodnie przechodzić tą barierę. W wielu przypadkach stosowane są inwazyjne metody podania leków uniemożliwiające chemiczne rozerwanie bariery krew-mózg lub implantację materiałów dozujących leki. Duże zainteresowanie naukowców skupiło się na systemach podawania leków przez kaniulę dozującą (*CEDD - Convection Enhanced Drug Delivery*). Zastosowanie tej metody wymaga przeprowadzenia badań obrazujących położenie guza mózgu, doprowadzenia kaniuli i infuzję leku w miejscu występowania guza. Metoda ta jest nadal w fazie eksperymentów lecz przewiduje się jej dużą przydatność w leczeniu pacjentów z glejakiem wielopostaciowym czy też chorobą Alzheimera.

Ośrodkowy układ nerwowy współtworzy jednostka centralna - mózgowie oraz rdzeń kręgowy. Mózgowie można dalej podzielić na kresomózgowie (dwie półkule dzielące się na płaty), międzymózgowie, śródmózgowie, tyłomózgowie oraz rdzeń przedłużony. Ośrodek ten zbudowany jest z istoty szarej (komórki nerwowe i glejowe, naczynia krwionośne i tkanka łączna) oraz białej (komórki glejowe oraz włókna nerwowe - neuryty). Funkcję ochronną dla ośrodkowego układu nerwowego pełnią kości czaszki oraz kręgosłup a także

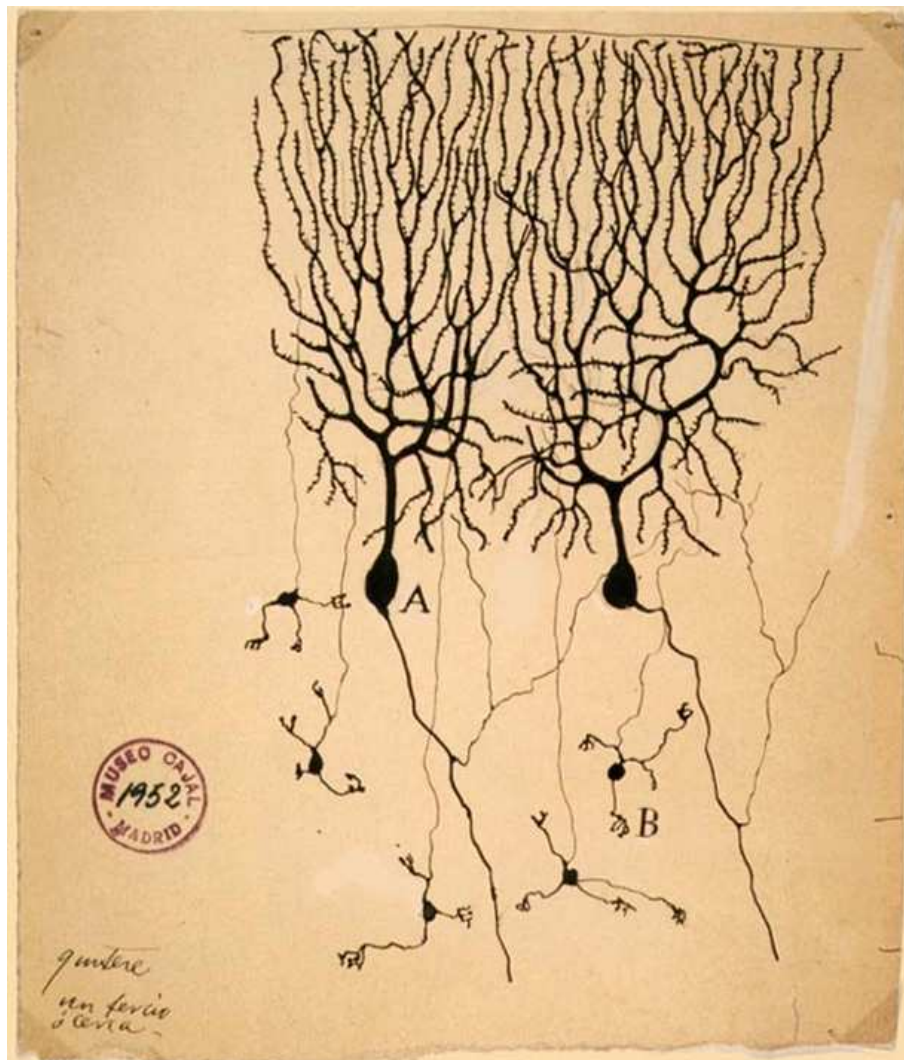
trzy błony pokrywające OUN (wymieniane od zewnątrz): opona twarda (*dura mater*), pajęczynówka (*arachnoidea*) oraz opona miękka rdzenia przylegająca bezpośrednio do tkanki mózgowej (*pia mater*). Pomiędzy oponą pajęczą a oponą mięką występuje przestrzeń podpajęczynówkowa wypełniona płynem mózgowo-rdzeniowym. Płyn ten cyrkuluje w komorach i przestrzeni podpajęczynówkowej amortyzując mózgowie. Pełni również funkcję transportującą przede wszystkim dla hormonów a także usuwa metabolity. Wydzielany jest w spłotach naczyniówkowych komór bocznych i komory trzeciej z szybkością około 24 ml/h, całkowita objętość płynu u dorosłego człowieka wynosi od 100 do 250 ml. Wchłonięcie płynu mózgowo-rdzeniowego z jamy podpajęczynówkowej do układu krwionośnego następuje w strukturze ziarnistości pajęczynówki wzdłuż zatok opony twardej.

Rozbudowana sieć naczyń krwionośnych przenika ośrodkowy układ nerwowy aby dostarczyć odpowiednią ilość glukozy oraz tlenu i odebrać produkty przemiany materii. Objętość układu krążenia w całej objętości mózgowia stanowi około 3%. Separację pomiędzy naczyniami krwionośnymi i płynem zewnątrzkomórkowym stanowi bariera krew-mózg. Stanowi ona ścisłą strukturę połączonych komórek śródbłonna (*tight junction*) otaczających całą ścianę naczyń krwionośnych. Uniemożliwia ona przedostanie się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgowia substancji rozpuszczalnych w wodzie (białek) a także bakterii (umożliwia transport glukozy). Identyczna bariera znajduje się pomiędzy naczyniami krwionośnymi a płynem mózgowo rdzeniowym.

Centralny układ nerwowy zbudowany jest z dwóch głównych typów komórek: neuronów i komórek glejowych. Neuron zbudowany jest z ciała komórki oraz odchodzących od niego wypustek (neurytów): długiego aksonu i krótkich dendrytów. Sieć neuronów komunikuje się ze sobą poprzez synapsy. Dendryty stanowią silnie rozgałęzioną część komórki nerwowej zakończoną synapsami i przenoszą informacje od innych komórek nerwowych w kierunku ciała komórki. Aksony przenoszą informacje z ciała komórki w kierunku synapsy i dla szybszego przewodzenia impulsu mogą być pokryte otoczką mielinową, tworzoną przez oligodendrocyty. Ze względu na pełnione funkcje i strukturę można je sklasyfikować na różne sposoby. Rozmiar ciała komórkowego ludzkiego neuronu ma średnicę około 20 μm , zaś długość aksonu wynosi od około 0,2 μm do kilku metrów dla neuronów sensorycznych.

Komórki glejowe (neuroglej) nie pełnią bezpośrednio funkcji przekazywania informacji, lecz określone typy tych komórek są wyspecjalizowane w konkretnych

działaniach umożliwiających funkcjonowanie komórek nerwowych. Współtworzą one barierę krew-mózg, tworzą otoczki mielinowe aksonów, wytwarzają oraz wychwytyją neuroprzekazniki oraz pełnią istotną rolę w przenoszeniu substancji odżywczych do komórek nerwowych. Komórki gleju można podzielić na: mikroglej i makroglej. Mikroglej odpowiada na infekcje i uszkodzenie tkanki nerwowej. Przechodzi on z formy spoczynkowej do aktywnej, czemu towarzyszy proliferacja i migracja mikrogleju w obręb uszkodzonej tkanki. Na makroglej składają się cztery główne typy komórek: astrocyty, oligodendrocyty, glej radialny oraz komórki ependymalne. Rola i funkcjonowanie komórek makrogleju w centralnym ośrodku jest dużo bardziej złożona, szczegółowe informacje można znaleźć w literaturze [106], [107].



Rys. 1.7. Rysunek komórki nerwowej Purkiniego i komórek ziarnistych z mózdzku gołębia, przedstawiony przez Santiago Ramón y Cajal 1899 r. Instytut Cajal, Madryt, Hiszpania.

1.7.1. Uszkodzenie mózgu

Jedną z najbardziej istotnych przyczyn zagrożeń zdrowia i życia współczesnych ludzi na całym świecie, po chorobach naczyniowych i nowotworach, stają się uszkodzenia mózgowo-czaszkowe w wyniku urazów. Częstość występowania urazów wynosi około 1,7 mln rocznie w USA [108]. Około 50 tys. osób umiera, zaś 275 tys. wymaga hospitalizacji. Wymagają oni również długotrwałego leczenia farmakologicznego, podwyższając koszty świadczeń społecznych i obciążając system opieki zdrowotnej. Pacjentów po ciężkich i rozległych urazach głowy w wyniku wypadków bardzo często nie udaje się uratować z powodu porażenia ośrodków pnia mózgu regulujących podstawowe czynności życiowe, zaś ci którzy przeżyli są w większości skazani na trwałe inwalidztwo w konsekwencji tak pierwotnych, jak i wtórnych urazów mózgu. Stan pacjentów ulega zazwyczaj poprawie w pierwszych 6-12 miesiącach po zdarzeniu, jednak u wielu osób utrzymują się długotrwałe negatywne następstwa wynikłe z uszkodzenia tkanek mózgu, np. uszkodzenie nerwów czaszkowych, porażenia i niedowłady, zaburzenia mowy oraz następstwa powodujące chorobę Alzheimerera, chorobę Parkinsona czy też padaczkę [109], [110]. W wyniku uszkodzenia tkanki nerwowej wskutek zdarzeń mechanicznych lub chirurgicznych dochodzi do uruchomienia kaskady zmian prowadzących do neurodegeneracji i atrofii mózgu [106]. Obserwacja zmian w tkance mózgowej występujących w długim czasie po urazie ma zasadniczy wpływ na poznanie procesów odpowiedzialnych za wtórne uszkodzenie mózgu. Badania prowadzone na modelu zwierzęcym z chirurgicznym uszkodzeniem mózgu (*Surgical Brain Injury - SBI*) pozwalają na obserwacje zmian na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Wskutek uszkodzenia przerwana zostaje integralność ośrodkowego układu nerwowego i bariery krew-mózg pozwalając na przedostanie się albumin, fibronektyny i fibrynogenu do parenchymy [106]. Przerwanie integralności bariery krew-mózg następuje z powodu mechanicznych uszkodzeń naczyń krwionośnych i działania wolnych rodników. W kilka godzin po urazie, obręb mózgu infiltrują leukocyty, monocyty oraz makrofagi. Komórki mikrogleju i astrocyty migrują w obręb uszkodzenia lub też proliferują w miejscu uszkodzenia, następuje produkcja cytokin a także fagocytoza uszkodzonych części tkanki. Astrocyty tworzą bliznę glejową, po której rozpadzie dochodzi do wtórnej neurodegeneracji i śmierci komórek nerwowych. 24 godziny po uszkodzeniu kory mózgowej obserwowana była nekroza komórek nerwowych, zaś w późniejszym czasie ślady apoptozy neuronów [106]. Obserwacja tkanki mózgowej po 6 i 12 miesiącach wykazała, że defekty powstawania nowych naczyń krwionośnych i destabilizacja blizny

glejowej doprowadziły do utraty znacznej części tkanki mózgowej [106].
Zapobieganie tego typu procesom jest głównym celem obecnej pracy.

1.7.2. Transport leku w mózgu

Przestrzeń międzykomórkowa wypełniona płynem śródmiąższowym to wzajemnie przenikające się wąskie kanały pomiędzy komórkami umożliwiające transport wielu składników w obrębie mózgowia. Pomimo małych rozmiarów kanałów rzędu 20-60 nm, zajmuje ona około 20% objętości mózgu [111], [112]. Pośredniczy w komunikacji komórkowej jak również transporcie składników odżywczych i metabolitów. W wielu pracach dotyczących dyfuzji substancji w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, przestrzeń tą traktuje się jako ośrodek porowaty. Wyróżnić można struktury stałe (komórki nerwowe i glejowe) oraz przestrzeń w której następuje przepływ składnika. Heterogeniczna struktura mózgu różni się w zależności od lokalizacji. Istota szara ma małą przenikalność lecz jednocześnie jest bardziej jednorodna i izotropowa. Istota biała w której znajdują się włókna nerwowe jest anizotropowa ale jednocześnie ma dużą przenikalność. Wskutek urazu tkanki mózgowej często obserwowany jest wzrost ilości płynu w tych strukturach i pojawienie się obrzęku mózgu. Transport leku w obrębie tkanki mózgowej jest procesem złożonym i ma na niego wpływ wiele czynników fizycznych i chemicznych [113]:

- dyfuzja w przestrzeni międzykomórkowej,
- odwracalne i nieodwracalne wiązanie z matrycą zewnątrzkomórkową,
- degradacja przez enzymy,
- aktywny lub pasywny transport do komórek ośrodkowego układu nerwowego,
- dyfuzja i konwekcja wewnątrz cytozolu komórkowego,
- wychwyt leku do jądra komórkowego,
- eliminacja w krwioobiegu,
- przepływ leku w przestrzeni międzykomórkowej wskutek pojawienia się obrzęku
- anizotropia tkanki.

W literaturze znane są dwa różne podejścia do opisu transportu w tkance mózgowej: model sztywny oraz poroelastyczny. Pierwszy z nich zakłada izotropię i homogeniczność tkanki i dotyczy głównie transportu dyfuzyjnego. Wskutek złożoności struktury modelowanie infuzji płynu do tkanki mózgowej i pojawienia się przepływu w tkance wymaga stosowania metod numerycznych dla rozwiązania równań transportu leku [111]. W drugim przypadku do opisu transportu leku uwzględnia się elastyczność tkanki

mózgowej. Taki opis stosowany jest głównie w przypadku wystąpienia deformacji tkanki mózgowej wskutek pojawienia się obrzęku mózgu lub infuzji płynu z lekiem metodą CEDD [114]. W niniejszej pracy ograniczono się do modelu sztywnego w którym analizowano dyfuzję i eliminację uwalnianego składnika.

Materiały i metody

2.1. Polimery i rozpuszczalniki

Do przygotowania nanowłókien w pracy wykorzystano następujące polimery:

- poli(L-laktyd-*co*-karolakton) (PLC, zawierający 70% L-laktydu i 30% kaprolaktonu) Purasorb PLC7015, Corbion Purac, Biochem BV, Holandia,
- poli(DL-laktyd-*co*-glikolid) (PDLG, zawierający 50% DL-laktydu i 50% glikolidu) Purasorb PDLG5010, Corbion Purac, Biochem BV, Holandia,
- poli(L-laktyd) (PLLA), Purasorb PL18, Corbion Purac, Biochem BV, Holandia,
- poli(tlenek etylenu) (PEO, $M_w = 400\ 000$) Sigma Aldrich, Polska.

W każdym przypadku polimery rozpuszczane były w mieszaninie chloroformu (CHCl_3 , POCh, Polska) i N,N-dimetyloformamidu (DMF, POCh, Polska). Jako punkt wyjściowy stosowano roztwory o stężeniu 9% wag. polimeru w mieszaninie DMF: CHCl_3 9:1. W celu optymalizacji jakości elektroprzędzenia zmieniano wzajemny stosunek obu rozpuszczalników. Do stworzenia emulsji użyto następujących surfaktantów: SPAN-80 (Sigma Aldrich, Polska), Triton-X (Sigma Aldrich, Polska) oraz dodecylosiarczanu sodu (SDS, POCh, Polska).

2.2. Formowanie nanowłókien

Elektroprzędzenie prowadzono w komorze o objętości ok. $1\ \text{m}^3$, z użyciem zasilacza wysokiego napięcia umożliwiającego prowadzenie procesu przy napięciu do 30 kV. Objętościowe natężenie przepływu roztworów polimerów regulowano systemem pomp

strzykawkowych. Jako kolektora używano bębnow (1, 3, 9 cm średnicy) wykonujących ruch obrotowy z prędkością do 3000 obr./min. Bębny wykonano z polipropylenu, materiał zbierany był na uziemiony pasek folii aluminiowej o powierzchni około 10 cm². W wyniku elektroprzędzenia użycie 0,8 ml roztworu polimeru pozwoliło na utworzenie na podanej powierzchni materiału o grubości od 25 do 150 μm. Materiał pozostawiano na bębnie do następnego dnia dla całkowitego odparowania resztek rozpuszczalnika i zrelaksowania naprężeń, unikano w ten sposób zwijania materiału.

2.3. Zastosowane leki i ich analogi

W niniejszej pracy w badaniach biomedycznych użyto trzy typowe leki neuroprotektyjne: alfa-tokoferol, NGF (*Nerve Growth Factor*), BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*). Wybór leków podyktowany był miejscem zastosowania i rolą jaką miały one spełnić dla regeneracji tkanki mózgowej. Powstały na skutek urazu stres oksydacyjny może przyczynić się do śmierci komórki [115]. Przeciwutleniacz (alfa-tokoferol) uwalniany w mózgu może pełnić rolę neuroprotektyjną z uwagi na hamowanie produkcji wolnych rodników. Czynniki wzrostu nerwów NGF i neurotrofowy czynnik pochodzenia mózgowego BDNF to białka sygnalizujące, odpowiedzialne za przeżycie i rozwój komórki nerwowej. W wielu badaniach medycznych zaobserwowano pozytywny wpływ zewnętrznie podanego NGF na przeżycie neuronów cholinergicznym [116]. Podanie BDNF *in vivo* stymulowało i kontrolowało neurogenezę [117]. Dobór leków został skonsultowany w ramach projektu wykonywanego wraz z Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk. Z uwagi na duży koszt tych leków jak i trudności w dokładnej detekcji ich stężenia, do badań modelowych użyto ich analogów, substancji o podobnej masie molowej i własnościach fizyko-chemicznych.

2.3.1. Leki lipofilowe

Przeciwutleniacz alfa-tokoferol (#T3251, Sigma Aldrich, Polska) o masie molowej 430,69 (g/mol) dodano do roztworu polimeru aby w rezultacie otrzymać 5, 10 i 15% wag. stężenie alfa-tokoferolu względem masy polimeru.

Jako analog leku o bardzo podobnej masie molowej zastosowano barwnik fluorescencyjny Rodaminę B (#234141, Sigma Aldrich, Polska, wzbudzenie/emisja 540/625 nm), której masa molowa wynosi 479 g/mol i jest o 11% większa od docelowego składnika. Zastosowanie substancji o podobnej masie molowej pozwoliło na zachowanie podobnego współczynnika dyfuzji w badanym materiale.

2.3.2. Leki hydrofilowe

Rekombinowane białko NGF (#556-NG-100) i rekombinowany BDNF (#248-BD-025) zakupiono w firmie R&D Systems. Oba białka rekonstruowano zgodnie z protokołem dostawcy, podzielono na części i zamrożono w ciekłym azocie. Oba białka mają masę około 13,4 kDa.

Jako analog neurotrofin wybrano powszechnie stosowaną albuminę surowicy wołowej (BSA, Sigma Aldrich, Polska) oraz BSA związane z izotiocyjanianem fluoresceiny (BSA-FITC, wzbudzenie/emisja 490/525 nm; #A9771, Sigma Aldrich, Polska). Masa albumin wynosi około 66 kDa.

Tab. 2.1 Stosowane leki i ich analogi

Lek docelowy	Analog
Lipofilowe – włókna monolityczne, core-shell	
alfa-tokoferol 430Da, $r_h = 0,9\text{nm}$	Rodamina B 479Da, $r_h = 0,9\text{nm}$
Hydrofilowe – core-shell, elektroprzędzenie emulsji	
Czynniki wzrostu nerwów NGF 13,4kDa, $r_h = 2,8\text{nm}$	Białko surowicy bydlęcej związane z izotiocyjanianem fluoresceiny BSA-FITC 66kDa, $r_h = 4,8\text{nm}$
Czynniki neurotropowe pochodzenia mózgowego BDNF 13,6kDa, $r_h = 2,8\text{nm}$	

2.4. Metody wprowadzenia leków do materiału

Istnieje szereg metod umieszczania leków wewnątrz czy też na powierzchni nanowłókien. Większość z nich omówiono w rozdziale 1.3. Poniżej przedstawiono jedynie zastosowane metody wprowadzania leków do wnętrza nanowłókien.

2.4.1. Uwięzienie leków w nanowłóknie

2.4.1.1. Włókna homogeniczne (monolityczne)

Używano pojedynczej igły jednorazowej o rozmiarze 26G, którą przycinano na długość około 4 mm i dokładnie wyrównywano odcięte brzegi dyszy. Igłę umieszczano na strzykawce jednorazowej zawierającej roztwór polimeru z lekiem. Strzykawka podłączona była do układu hydraulicznego z pompą strzykawkową. Przygotowanie roztworu polimeru

z lekiem lub analogiem polegało na rozpuszczeniu leku lub analogu w roztworze polimeru, a następnie homogenizacji w wytrząsarce przez około 30 minut. Warunki wyjściowe od których rozpoczynano elektroprzędzenie: natężenie przepływu 800 $\mu\text{l/h}$, napięcie 15 kV oraz odległość dysza-kolektor 15 cm. W zależności od przebiegu procesu elektroprzędzenia tj. stabilności przędzenia lub urywania się kropeł spod dyszy, powyższe parametry zmieniano aby ustabilizować proces.

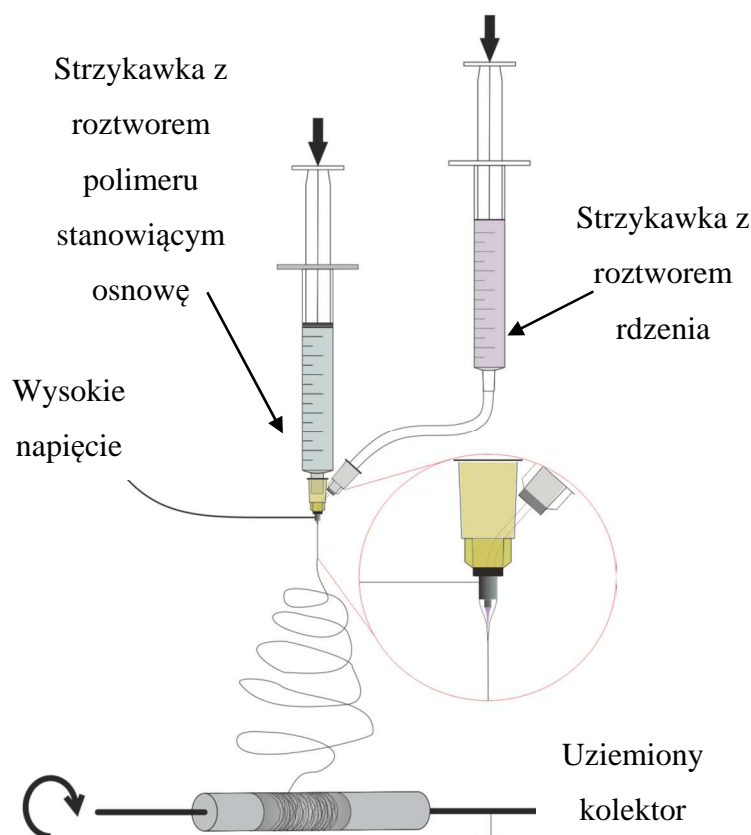
2.4.1.2. Włókna elektroprzędzone z emulsji

Do przygotowania nanowłókien z emulsji wykorzystano taki sam zestaw jak w przypadku elektroprzędzenia włókien homogenicznych. Emulsję przygotowywano w określonej kolejności. Na początku do roztworu polimeru dodano surfaktantu i dokładnie wymieszano. Następnie do roztworu z surfaktantem zakraplano roztwór fazy wodnej z lekiem. Podczas każdorazowego dodania fazy wodnej, całość intensywnie mieszano w wytrząsarce. Po 15 minutach od dodania ostatniej części fazy wodnej, krople emulsji rozbijano w myjce ultradźwiękowej przez 15 minut. Kroplę gotowej emulsji przenoszono na szkiełko mikroskopowe do obserwacji wielkości kropeł. Elektroprzędzenie emulsji rozpoczynano od parametrów wyjściowych: 500 $\mu\text{l/h}$, napięcie 20 kV oraz odległość dysza-kolektor 15 cm.

2.4.1.3. Struktura typu rdzeń w osnowie

Do elektroprzędzenia w tym układzie wykorzystano współosiową dyszę wykonaną z dwóch igieł strzykawkowych: wewnętrznej o rozmiarze 27G i zewnętrznej 20G. Igła zewnętrzna była przycięta na długość 5mm, igła wewnętrzna była ścięta tak, aby na 0,5 mm wystawała z igły wewnętrznej. Współosiowość igieł ustawiana była pod mikroskopem stereoskopowym. Obydwie igły były połączone ze strzykawkami zawierającymi roztwory do elektroprzędzenia dozowane za pomocą pomp strzykawkowych. Obie pompy znajdowały się poza komorą. Igła zewnętrzna podłączona była do układu hydraulicznego, igła wewnętrzna połączona była z pompą za pomocą węża teflonowego częściowo wypełnionego wodą dejonizowaną lub heksanem. Roztwór dozowany z igły zewnętrznej tworzył osnowę włókna. Roztwór dozowany z igły wewnętrznej tworzył rdzeń włókna. Schemat elektroprzędzenia przedstawiono na rysunku 2.1. Typowe natężenie objętościowe roztworu osnowy wynosiło 1500 $\mu\text{l/h}$, zaś rdzenia 500 $\mu\text{l/h}$. Jeżeli zauważalna była niestabilność kropli i nieprawidłowe tworzenie się włókien typu rdzeń - osnowa, regulowano odpowiednio

stosunek przepływów. Odległość pomiędzy dyszą a kolektorem wynosiła 20 cm. Napięcie regulowano w zakresie 19 - 24 kV.



Rys. 2.1. Schemat elektroprzędzenia typu rdzeń w osnowie.

2.4.2. Przestrzenne metody uwięzienia leków

Proces elektroprzędzenia nanowłókien dla wielowarstwowych struktur mat jest identyczny jak w przypadku przędzenia z pojedynczej dyszy. W pierwszym etapie na uziemiony kolektor zbierano nanowłókna tworzące barierę dla substancji leczniczej. Następnie po zmianie strzykawki z polimerem elektroprzędzono w takich samych warunkach nanowłókna z lekiem. Na koniec ponownie przędzono roztwór polimeru stanowiący drugą barierę. Zmianę grubości poszczególnych warstw realizowano przez zmianę objętości elektroprzędzonego roztworu.

2.5. Środowisko uwalniania leków (krzywe wzorcowe i profile uwalniania)

Uwalnianie leków i ich analogów prowadzono w 0,01M buforze fosforanowym o pH = 7,4 (*Phosphate Buffered Saline* – PBS, Sigma Aldrich, Polska) w temperaturze 37°C imitując warunki fizjologiczne. Po elektroprzędzeniu wycinano fragment materiału o powierzchni około 1cm² i ważono w celu określenia zawartości uwalnianej substancji.

W przypadku gdy zawartość uwalnianej substancji w materiale była mniejsza niż 1% i zachodziła ewentualność oznaczania na granicy progu wykrywalności, przykładano uwagę aby masa materiałów nie była niższa niż 10 mg. Uwalnianie prowadzono w plastikowych fiolkach eppendorfa (Carl Roth, Polska), zanurzając materiały w 1 ml buforu PBS. Fiolki zabezpieczono przed wpływem światła. Przesącz z uwolnionym lekiem wymieniano w zaplanowanych odstępach czasu, a następnie pozostały roztwór zalewano świeżym buforem. Zebrany płyn zamrażano do czasu przeprowadzenia oznaczeń stężenia uwalnianej substancji.

Drugą metodą oceny uwalniania substancji z nanowłókien była analiza transportu substancji w hydrożelu metodą optyczną (rozdział 4.2). Pierwsze eksperymenty wykonano w hydrożelu z agarozy. Materiał charakteryzował się dużym rozpraszaniem wiązki lasera. Kolejne eksperymenty prowadzono w hydrożelu Pythagel™ (Sigma Aldrich, Polska), starając się dopasować stężenie substancji żelującej. Zaobserwowano rozpraszanie wiązki lasera, uniemożliwiające prowadzenie dalszych badań. W kolejnym etapie wykonano hydrożel PVA. Hydrożel poli(alkoholu winylowego) (PVA, $M_w = 72$ kDa, stopień hydrolizy $< 89\%$, POCh, Polska) usieciowany boraksem przygotowano przez rozpuszczenie 3,2 g polimeru PVA w 60 ml wody dejonizowanej o temperaturze 85°C . Rozpuszczanie przeprowadzano na płycie grzejnej z zachowaniem temperatury mieszanego roztworu poniżej 90°C . Po całkowitym rozpuszczeniu polimeru, do roztworu dodano 7 ml 0,1M roztworu boraksu i mieszano przez 15 minut. Gorący hydrożel przeniesiono do poliwęglanowej kuwety o rozmiarze 5 x 4 x 3 cm. Pęcherze powietrza obecne w hydrożelu usunięto w ekzykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem. Po wystygnięciu, kuwetę z hydrożelem zabezpieczono przed wyschnięciem oklejając Parafilmem® (Sigma Aldrich, Polska) i umieszczono w lodówce w 4°C na 24 godziny. Tak przygotowany hydrożel, po wyjęciu z lodówki i wyrównaniu temperatury zachował odpowiednie właściwości mechaniczne, nie wykazując płynięcia po przechyleniu kuwety o 90° . Hydrożel był transparentny dla niebieskiej i zielonej wiązki lasera, nie zaobserwowano rozpraszania światła lasera na łańcuchach polimeru.

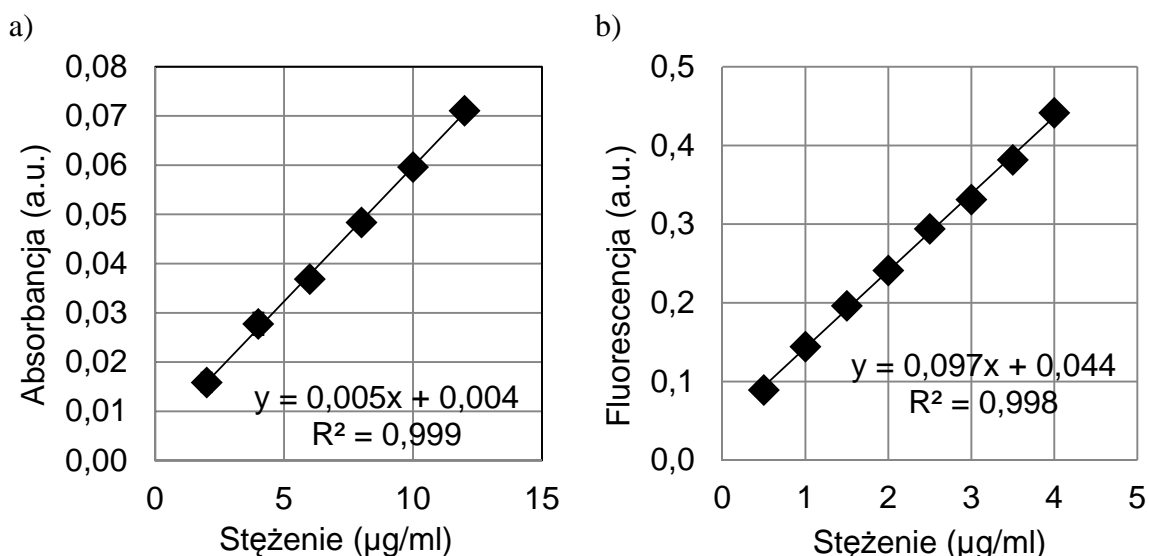
2.5.1. Leki lipofilowe

Uwalnianie leków lipofilowych prowadzono w buforze 0,01M PBS zawierającym 0,25% dodecylosiarczanu sodu (SDS, POCh, Polska). Tak utworzony roztwór micelarny absorbował uwalniane leki.

Do oznaczenia zawartości alfa-tokoferolu wykorzystano spektrofotometryczną metodę Emmeri-Engela [118]. Analizowane próbki przed oznaczeniem rozmrożono i do każdej dodano 1 ml alkoholu etylowego aby zniszczyć micelle. Następnie przeprowadzono ekstrakcję alfa-tokoferolu przez dodanie 2 ml rozpuszczalnika organicznego (heksan) do każdej z próbek. Po intensywnym mieszaniu, a następnie rozdzieleniu faz, fazę organiczną przenoszono do szklanych fiolek i dodawano do każdej 0,25 ml roztworu batofenantroliny (Sigma Aldrich, Polska) w etanolu absolutnym (99,9%) (POCH, Polska). Następnie dodano 0,25 ml chlorku żelaza (Sigma Aldrich, Polska) w roztworze etanolu absolutnego i mieszano przez minutę. Na koniec dodano 0,25 ml kwasu ortofosforowego (Sigma Aldrich, Polska) w roztworze etanolu absolutnego. Objętość 140µl (na dołek) wymieszanego roztworu przeniesiono do sześciu dołków płytki 96-dołkowej. Absorbancję mierzono w spektrofotetrze (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA) dla długości fali $\lambda = 539$ nm. Stężenie alfa-tokoferolu w próbkach określano wykorzystując krzywą wzorcową (Rys. 2.2a.).

Tab. 2.2. Stężenia składników do oznaczenia alfa-tokoferolu.

Roztwory w etanolu absolut.	Masa molowa (g/mol)	Stężenie molowe (mM)	Objętość (ml)
Batofenantrolina	332,0	6	0,25
Chlorek żelaza (III)	162,2	1	0,25
Kwas ortofosforowy	98,9	40	0,25



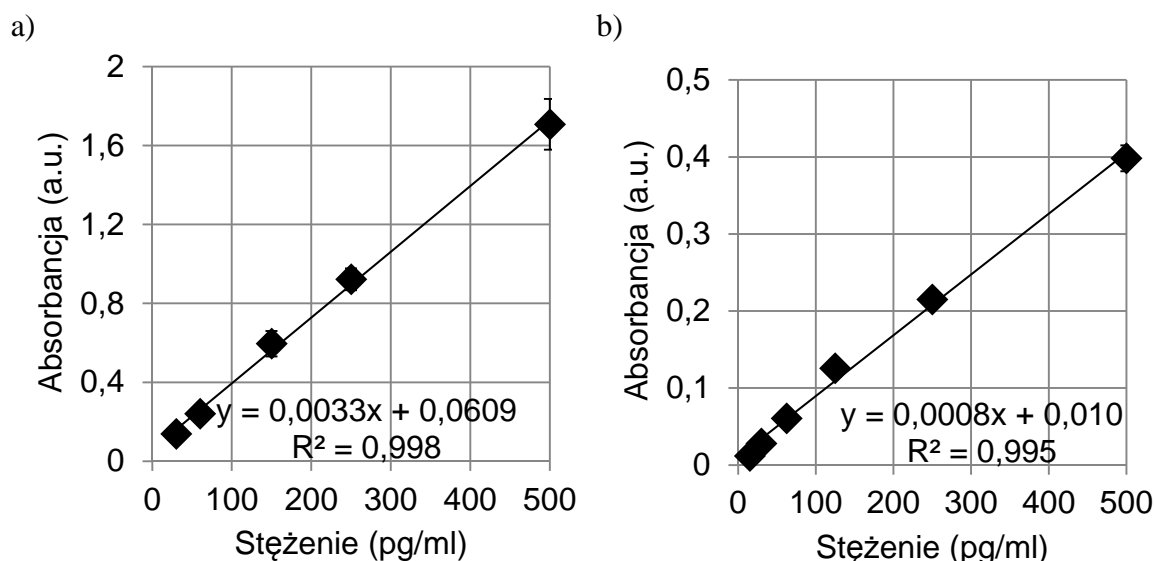
Rys. 2.2. Krzywa wzorcową a) alfa-tokoferolu i b) Rodaminy B.

Analog alfa-tokoferolu - Rodaminę B oznaczano fluorymetrycznie (Fluoroskan Ascent™ Microplate Fluorometer, Thermo Scientific, USA). Objętość 150 μ l/dołek przeniesiono do trzech dołków i oznaczano przy długości fali wzbudzenia $\lambda_w = 485$ nm i emisji $\lambda_e = 538$ nm. Stężenie uwolnionej substancji odczytano z krzywej wzorcowej (Rys. 2.2b).

2.5.2. Leki hydrofilowe

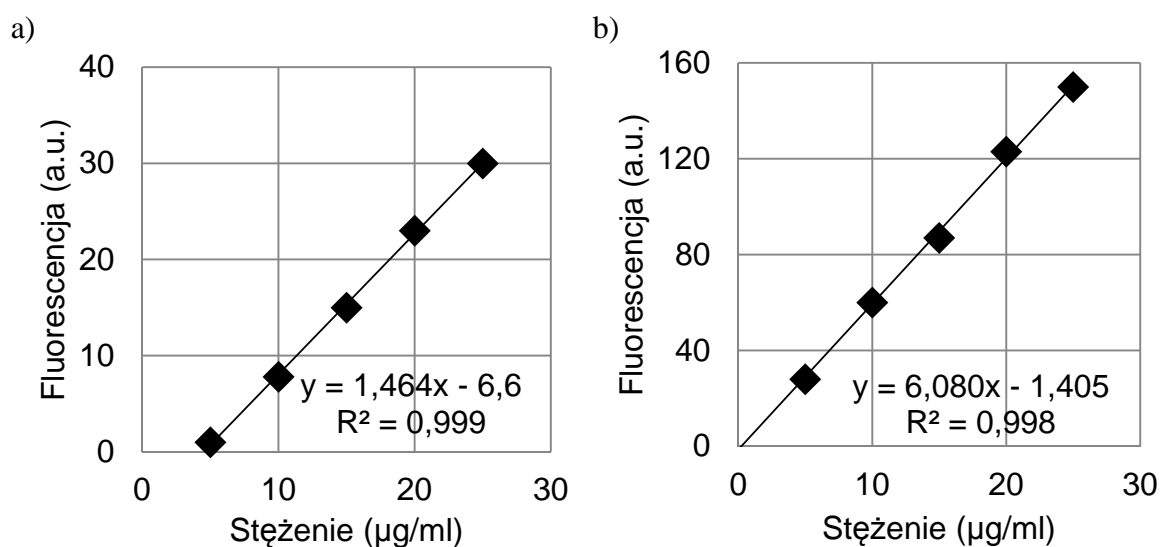
Uwalnianie czynników wzrostu prowadzono w buforze 0,01M PBS zawierającym 1% BSA. Dodatek białka blokował powierzchnię fiolek i uniemożliwiał adsorpcję czynników wzrostu.

Uwalniane białka NGF i BDNF oznaczano metodą immunoenzymatyczną (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA*). Próbki z przesączem rozmrożono i poddano analizie z wykorzystaniem kitów do oznaczania białek NGF lub BDNF DuoSet ELISA kit (#DY556, #DBD00, R&D Systems, USA). Analizę przeprowadzono zgodnie z protokołami wytwórcy. W przypadku oznaczania białka NGF, 96-dołkowe płytki (Nunc-Immuno™ Microwell™, Sigma Aldrich, Polska) pokryto przeciwciałem wychwytyjącym, a następnie niezwiązane miejsca zablokowano roztworem 1% BSA. Tak przygotowane próbki przepłukano, a następnie wypełniono roztworami standardowymi oraz próbkami eksperymentalnymi. Płytkę pozostawiono na 30 minut inkubacji. Przepłukane dołki płytki wypełniono przeciwciałem wykrywającym, a po przepłukaniu, wypełniono roztworem peroksydazy chrzanowej z zestawu ELISA. Do wywołania barwnego produktu, płytki wypełniono roztworem TMB (#T4444-100, Sigma Adrich, Polska), a następnie reakcję zablokowano przez dodanie 2N kwasu siarkowego (Sigma Adrich, Polska). Absorbancję płytek odczytano przy użyciu spektrofotometru. Stężenie obliczono przez odjęcie absorbancji dla długości fali $\lambda_1 = 540$ nm od absorbancji dla długości fali $\lambda_2 = 450$ nm. Stężenie oznaczanego białka wyznaczano z krzywej wzorcowej wykonanej każdorazowo dla nowej płytki. Oznaczanie białka BDNF wykonano na płytce 96-dołkowej z naniesionym przeciwciałem wychwytyjącym. Kolejne kroki procedury oznaczania białka były identyczne jak w przypadku NGF. Krzywe wzorcowe NGF i BDNF dla jednej z analizowanych płytek przedstawiono na rysunku 2.3a i 2.3b.



Rys. 2.3. Krzywa wzorcowa a) NGF i b) BDNF.

Dla BSA, analogu czynników wzrostu, stężenie oznaczano metodą OPA [119]. W metodzie tej do dołka zawierającego 150 μ l przesącza z BSA, dodano 150 μ l mieszaniny roztworów o-ftalaldehydu (Sigma Aldrich, Polska) i 2-merkaptioetanolu (Sigma Aldrich, Polska) w etanolu oraz buforu boranowego (POCH, Polska). Oznaczanie fluorymetryczne prowadzono przy długości fali wzbudzenia $\lambda_w = 355$ nm i emisji $\lambda_e = 460$ nm. Stężenie uwolnionej substancji odczytano z krzywej wzorcowej (Rys. 2.4a). Drugi z analogów BSA-FITC oznaczano metodą fluorymetryczną. Objętość 150 μ l/dołek przeniesiono do trzech dołków i oznaczano przy długości fali $\lambda_w = 485$ nm i emisji $\lambda_e = 538$ nm. Stężenie uwolnionej substancji odczytano z krzywej wzorcowej (Rys. 2.4b).



Rys. 2.4. Krzywa wzorcowa a) BSA i b) BSA-FITC.

2.6. Metody obrazowania nanowłókien

2.6.1. Mikroskopia optyczna i fluorescencyjna

Podczas procesu elektroprzędzenia na szkiełka mikroskopowe w odstępie kilku minut zbierano próbki nanowłókien. Obserwacja włókien na mikroskopie epifluorescencyjnym (Nikon Eclipse E-50i, DMI3000B, Leica Microsystems, Niemcy) pozwalała na sprawdzenie obecności fluorescencyjnych analogów leku we włóknie i bieżące korygowanie parametrów elektroprzędzenia. Dodatkowo służyła do wstępnej oceny morfologii włókien. Brano pod uwagę grubość włókien czy też ewentualne występowanie koralików na włóknie.

Na etapie tworzenia emulsji do fazy wodnej zamiast czynników wzrostu dodano BSA-FITC. Miało to na celu określenie wielkości kropeł tworzonej emulsji. Mikroskop epifluorescencyjny z kamerą (Manta G-201C, Allied Vision Technologies, Niemcy) został użyty do oceny wielkości kropeł wody w zależności od ilości użytej fazy wodnej i typu surfaktantu.

2.6.2. Mikroskopia konfokalna

Część próbek charakteryzowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego (TCS SP5, Leica Microsystems, Niemcy). Umożliwiło to na precyzyjne określenie obecności struktury rdzenia w nanowłóknie.

2.6.3. Mikroskopia elektronowa

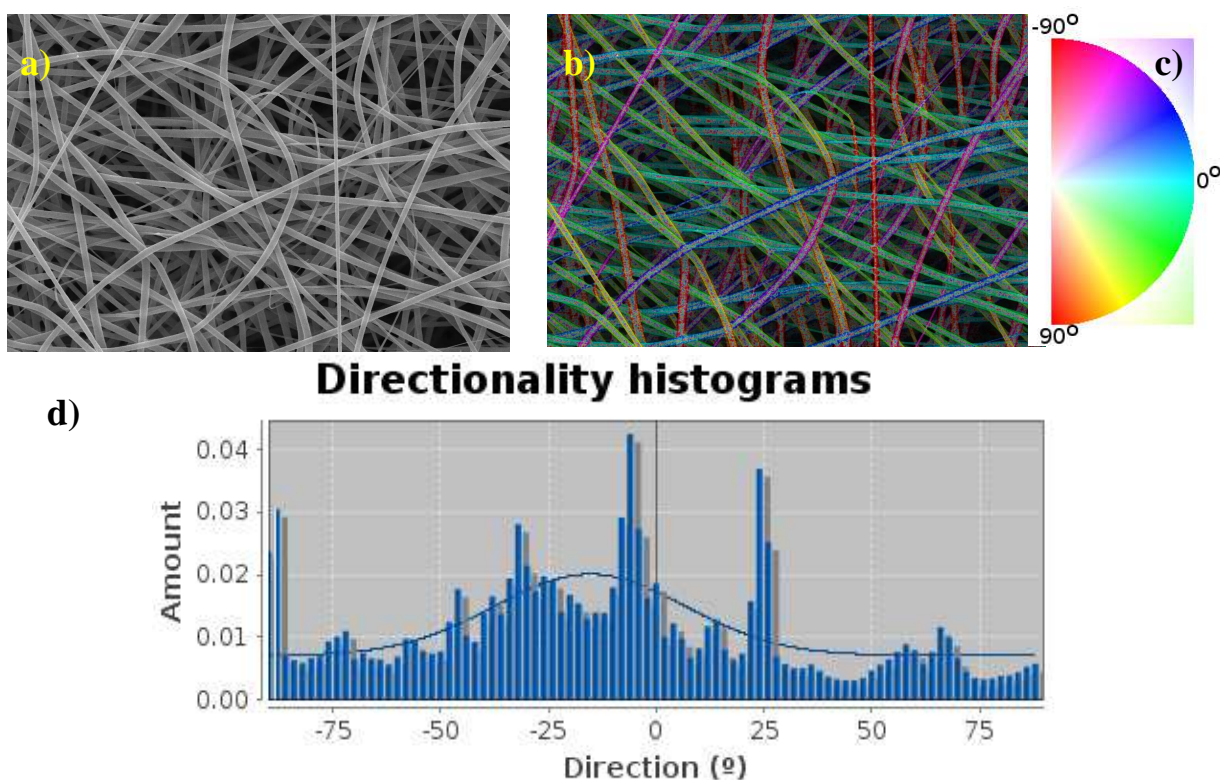
Morfologię nanowłókien w materiale obrazowano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (Scanning Electron Microscope - SEM, Jeol, JSM 6390 LV, Japonia). Przed obrazowaniem, materiały z nanowłókien umieszczono na metalowym stoliku i pokryto warstwą złota (napylarka Polaron, SC 7620, W. Brytania). Materiały badano przy napięciu przyspieszającym od 10 do 20 kV.

2.6.3.1. Pomiar rozkładu grubości włókien

Grubość nanowłókien mierzono ze zdjęć mikroskopii elektronowej, stosując w tym celu program graficzny ImageJ (National Institutes of Health, USA). Pierwszym krokiem było zmierzenie liczby pikseli ze skali zdjęcia i kalibracja długości przypadającej na jeden piksel. Nanowłókna mierzono z trzech zdjęć uzyskując około stu pomiarów grubości włókien. Pojedyncze włókno mierzono jednokrotnie.

2.6.3.2. Pomiar ukierunkowania włókien

Ukierunkowanie nanowłókien określano w programie ImageJ posługując się dodatkiem OrientationJ [78]. W przypadku przedstawionego obrazu (Rys. 2.5.), orientacja nanowłókien (zgodnie z przyjętym oznaczeniem kierunków na legendzie) wynosi $-15,35^\circ$, zaś odchylenie standardowe wynosi $22,1^\circ$.

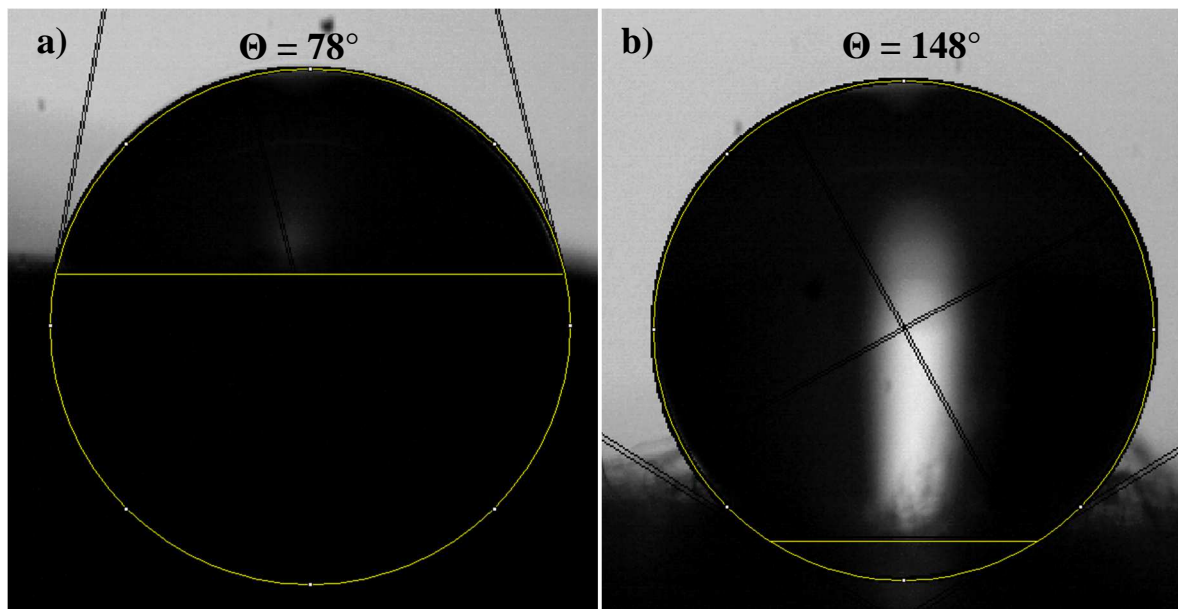


Rys. 2.5. Kolejne etapy pomiaru ukierunkowania nanowłókien: a) obraz nanowłókien SEM, b) graficzny wynik działania algorytmu do określania kierunku włókien wraz z legendą, c) oznaczenia kolorów odpowiadające odpowiedniemu kierunkowi, d) histogram przedstawiający dominujące kierunki ułożenia nanowłókien.

2.7. Metoda pomiaru kąta zwilżania materiałów

Pomiar kąta zwilżania przeprowadzono w skonstruowanym przez autora układzie wyposażonym w stół przesuwany śrubą mikrometryczną, oświetlenie halogenowe oraz kamerę. Próbkę materiału o powierzchni 1 cm^2 umocowano taśmą dwustronną do stolika. Na powierzchnię materiału naniesiono kroplę wody dejonizowanej i niezwłocznie wykonano zdjęcie. Kąt zwilżania zmierzono w programie ImageJ posługując się dodatkiem Contact Angle [120]. Pomiaru dokonano zaznaczając na początku płaszczyznę na której znajdowała się kropla. W tym celu zmieniano próg czerni tak aby uzyskać wyraźny punkt kontaktu kropli z podłożem. Następnie na obwodni kropli zaznaczano od trzech do dziesięciu punktów, które program wykorzystał do obliczenia kształtu kropli i kąta zwilżenia materiału.

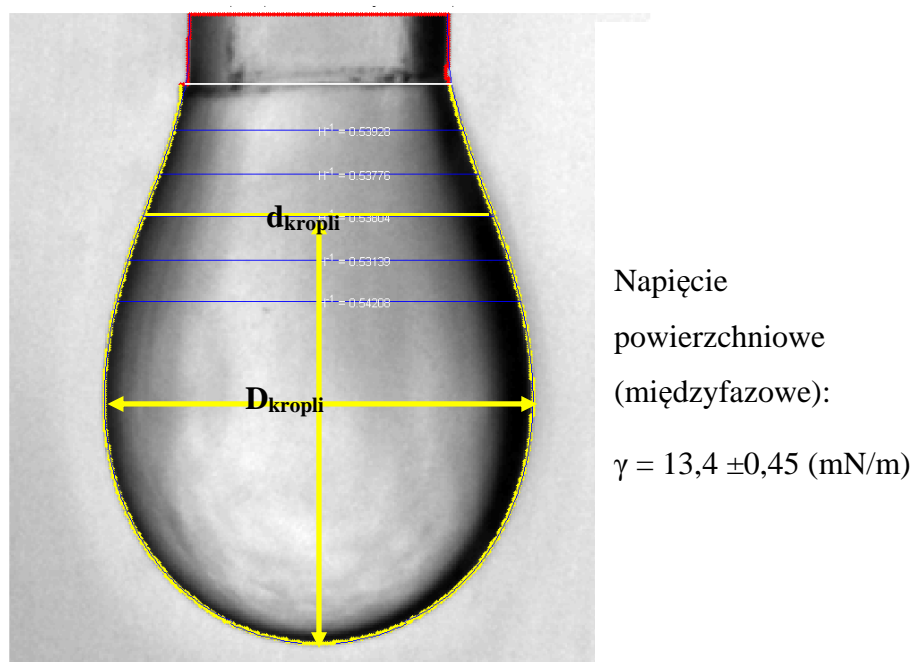
Na rysunku 2.6. przedstawiono dwa przykładowe zwilżalności materiałów z nanowłókien. Pierwszy to materiał hydrofilowy, gdzie kąt zwilżania wynosi 78° . Drugi materiał wykazuje cechy superhydrofobowe, zaś wyznaczony kąt zwilżania wynosi 148° .



Rys. 2.6. Kąt zwilżania materiałów z nanowłókien PLC. Hydrofilowy materiał a) elektroprzędzony z emulsji oraz hydrofobowy materiał b) z monolitycznych nanowłókien.

2.8. Metoda pomiaru napięcia powierzchniowego

Napięcie powierzchniowe na granicy faz kropla-powietrze i kropla-rozpuszczalnik zbadano metodą pomiaru kształtu zwisającej kropli. Badania wykonano w skonstruowanym przez autora układzie. W metodzie tej do obliczenia napięcia powierzchniowego wykorzystuje się zmierzoną szerokość i przewężenie kropli. Poziom przewężenia znajduje się odmierzając pionowo szerokość kropli od najniższej położonego jej punktu (Rys. 2.7.). W celu dokonania pomiarów wykorzystano kamerę, oświetlenie punktowe z matówką oraz układ strzykawki z igłą zawierający analizowany roztwór. W układzie dozującym kroplę, końcówkę obciętej na płasko igły umieszczono w transparentnej kuwecie o objętości 3 ml. W przypadku badań napięcia powierzchniowego na granicy kropla-powietrze, odseparowanie kropli od warunków zewnętrznych pozwoliło na uniknięcie poruszenia kropli spowodowane ruchem powietrza. W badaniach napięcia powierzchniowego pomiędzy kroplą a rozpuszczalnikiem, kuwetę wypełniano wybraną cieczą i wykonano zdjęcia do analizy. Obrazy przycinano do obszaru kropli i analizowano w programie Matlab® [121]. Dokładne obliczenia napięcia powierzchniowego z wykorzystaniem współczynników Juza [122] wykonano w skrypcie autorstwa Piotra Korczyka (IPPT PAN).



Rys. 2.7. Kształt kropli roztworu polimeru PLC w otoczeniu wody.

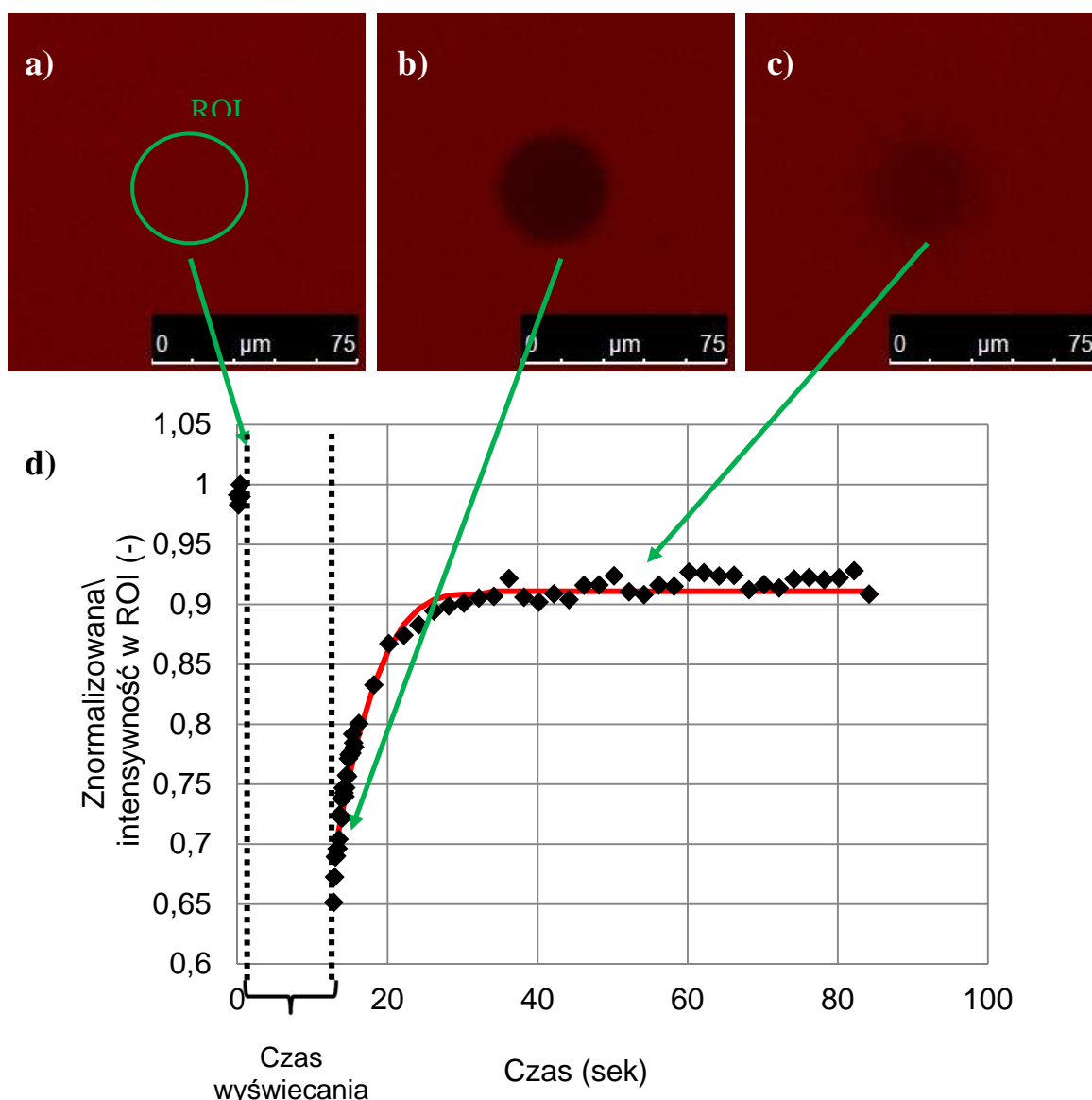
2.9. Metoda pomiaru porowatości nanowłókien

Porowatość materiałów z nanowłókien obliczano na podstawie porównania gęstości wytworzonego materiału i tabelarycznej gęstości użytego polimeru. Dziurkaczem do papieru wycięto fragment materiału, a następnie zważono. Fragment przecięto skalpelem na dwie równe części, a następnie pod mikroskopem optycznym w dziesięciu punktach zmierzono grubość przeciętej krawędzi.

2.10. Wyznaczanie współczynnika dyfuzji w hydrożelu PVA metodą FRAP

Metoda FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) polega na lokalnym wygaszeniu fluorescencji badanego materiału przy pomocy silnego impulsu lasera skupionego na niewielkim obszarze, a następnie na przeanalizowaniu procesu powrotu fluorescencji związanej z procesem dyfuzji cząsteczek czynnika fluorescencyjnego do oświetlonego obszaru. Badania prowadzono na mikroskopie konfokalnym (TCS SP5, Leica Microsystems, Niemcy) z dołączonym oprogramowaniem do analizy FRAP. W pierwszym kroku ustawiono parametry wzbudzenia i emisji badanej substancji (Rodamina B lub BSA-FITC) oraz czułość detekcji. W następnym kroku wybrano obszar na którym wygaszano fluorescencję (*Region Of Interest* - Rys. 2.8.a) oraz metodę Zoom In, która kierowała całą moc lasera na zaznaczonym obszarze do wyświecenia. Następnie ustawiono moc lasera na wartość maksymalną dla wyświecania (użyto wszystkich linii lasera argonowego) oraz 3-5% intensywności lasera dla obserwacji powrotu fluorescencji. W ostatnim kroku ustawiono

liczbę zdjęć, które program ma wykonać przed wyświeceniem (do określenia intensywności fluorescencji odniesienia), czas potrzebny do wyświecenia zaznaczonego obszaru oraz liczbę zdjęć po wyświeceniu (do obserwacji powrotu fluorescencji w wybranym obszarze ROI). Czas wyświecania powinien być jak najkrótszy (aby nie zaobserwować powrotu fluorescencji w czasie wygaszania) i jednocześnie wystarczający do wyświecenia wybranego obszaru. W przykładzie poniżej zaprezentowano wyniki wyświecania Rodaminy B w hydrożelu poli(alkoholu winylowego). Można zauważyć, że pomimo długiego czasu wyświecania (około 12 sekund) intensywność fluorescencji spadła jedynie o 35%.



Rys. 2.8. Poszczególne etapy eksperymentu FRAP: a) wybranie obszaru do wyświecenia i wyznaczenie intensywności fluorescencji, b) fluorescencja w obszarze ROI po wyświeceniu, c) powrót fluorescencji związany z dyfuzją cząsteczek do wyświeconego obszaru, d) przebieg intensywności fluorescencji w obszarze ROI w czasie.

Dane na temat intensywności fluorescencji w punkcie ROI, znormalizowano zgodnie z równaniem:

$$I_{\text{norm}}(t) = \frac{I_{\text{frap}}(t) - I_{\text{back}}(t)}{I_{\text{frap}_0}} \quad (2.1)$$

gdzie: $I_{\text{norm}}(t)$ – znormalizowana intensywność, $I_{\text{frap}}(t)$ – średnia intensywność wewnątrz wyświecanego obszaru, $I_{\text{back}}(t)$ – średnia intensywność tła (region poza wyświecanym obszarem), I_{frap_0} – średnia intensywność fluorescencji przed wyświeceniem obszaru ROI.

Do dopasowania parametrów modelu (dla okrągłego obszaru ROI) do danych eksperymentalnych wykorzystano równanie Soumpasisa [123]:

$$I_{\text{norm}}(t) = a_0 + a_1 \cdot e^{\frac{t}{2 \cdot (t - t_{\text{bleach}})}} \cdot \left[I_0 \left(\frac{\tau}{2 \cdot (t - t_{\text{bleach}})} \right) + I_1 \left(\frac{\tau}{2 \cdot (t - t_{\text{bleach}})} \right) \right] \quad (2.2)$$

gdzie: a_0 , a_1 – parametry normalizacyjne uwzględniające niecałkowite wyświecenie obszaru ROI oraz niepełny powrót fluorescencji, t_{bleach} – czas wyświecania, $I_0(x)$ i $I_1(x)$ – zmodyfikowane funkcje Bessela, τ – czas dyfuzji zdefiniowany wzorem:

$$\tau = \frac{w^2}{D} \quad (2.3)$$

gdzie: w – średnica wyświecanego obszaru, D – współczynnik dyfuzji.

2.11. Układ eksperymentalny do oceny procesu uwalniania leku z wybranych materiałów

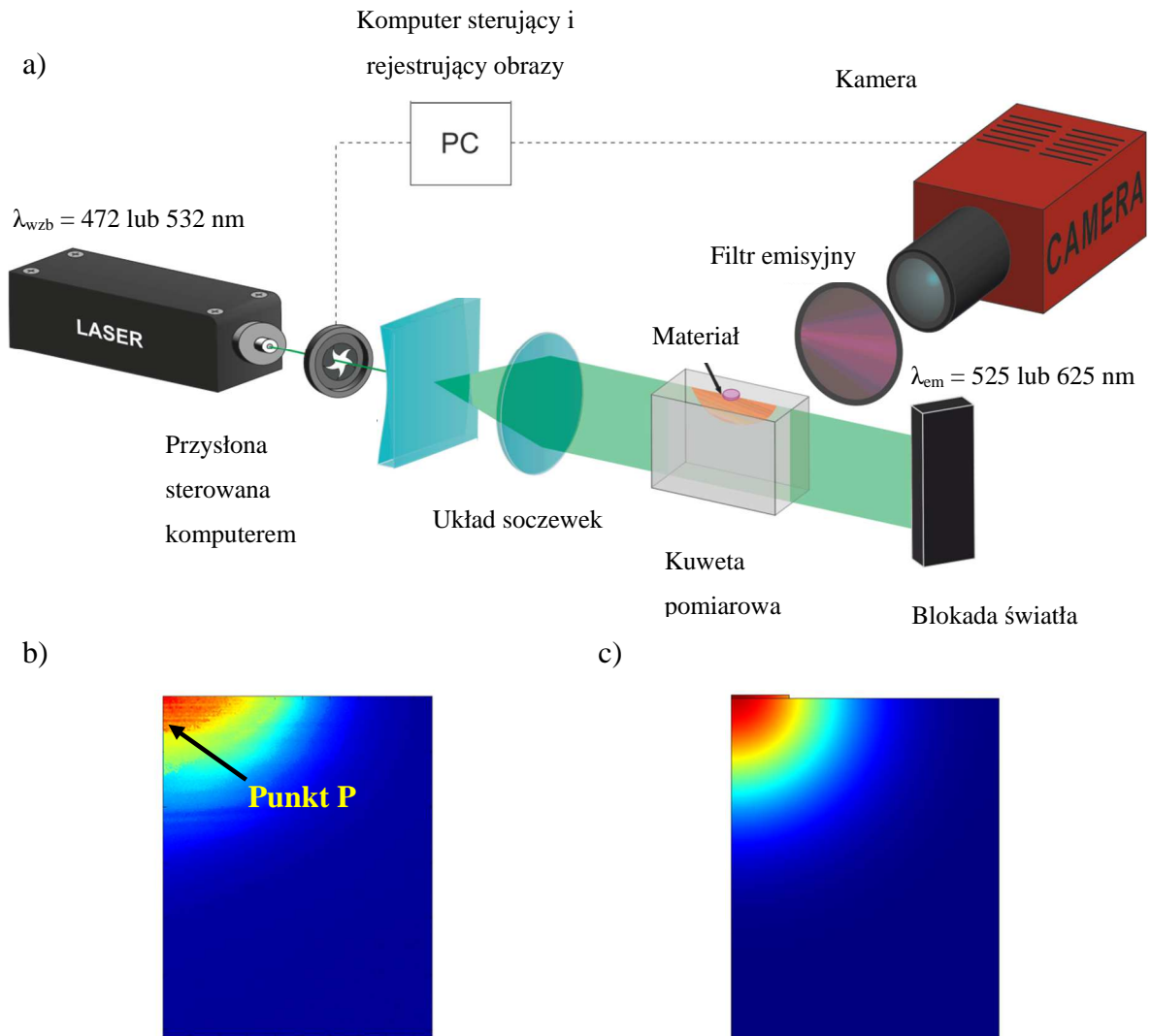
Na potrzeby walidacji modelu numerycznego oraz oszacowania stężenia leków w tkance mózgowej, skonstruowano układ eksperymentalny w którym uwalniano analogi leków z materiałów polimerowych uzyskanych w procesie elektroprzędzenia. Informacja o lokalnym stężeniu leku jest pomocna w oszacowaniu efektu terapeutycznego i ewentualnego przekroczenia toksycznej wartości stężenia. Przedstawiony poniżej układ eksperymentalny, dzięki zastosowaniu płaskiej wiązki lasera (tzw. noża świetlnego) wzbudzającej dyfundującą substancję fluorescencyjną pozwala na przedstawienie pola stężenia w wybranym położeniu w kuwecie pomiarowej wypełnionej hydrożelem. Zastosowanie takiego oświetlenia pozwoliło na bezpośrednią obserwację lokalnego stężenia analogu leku w danym punkcie kuwety, bez konieczności wykonywania transformacji rozkładu stężenia, jak to ma miejsce w przypadku oświetlania układu światłem wzbudzającym fluorofor w całej objętości układu [124]. W przypadku rejestracji światła emitowanego przez fluorofor z całej objętości układu lub rejestracji absorbancji barwnika rejestrowana jest uśredniona informacja o stężeniu barwnika. Wyznaczenie lokalnego

stężenia na podstawie sumarycznych wartości intensywności światła otrzymywanych przy oświetleniu objętości obarczone jest dużym błędem wynikającym z koniecznych założeń symetrii osiowej układu. Podejście takie komplikuje znalezienie wartości stężenia i jest źródłem błędów [124].

Opis stanowiska

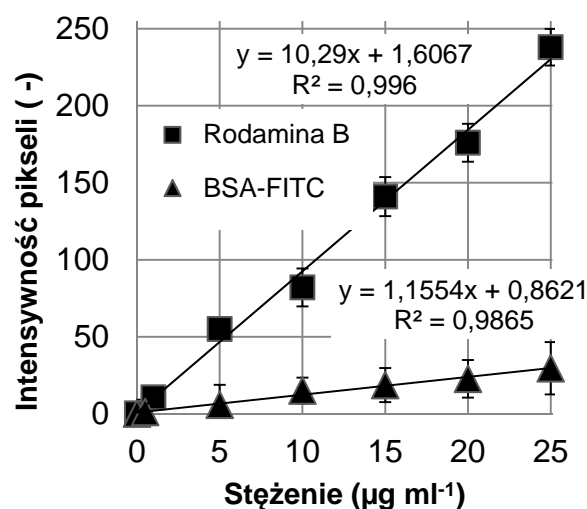
Rysunek 2.9a przedstawia schemat układu eksperymentalnego. Wiązka lasera o długości fali 532 nm lub 472 nm przechodzi przez przysłonę sterowaną komputerem. Światło lasera przekształcane jest w płaską wiązkę dzięki układowi dwóch soczewek: płasko-wklęsłej oraz dwuwypukłej. Światło przechodzące przez kuwetę pomiarową wypełnioną hydrożelem, wzbudza składnik fluorescencyjny dyfundujący z materiału umieszczonego na powierzchni hydrożelu. Emitowane światło przechodzi przez filtr emisyjny (Rodamina B – 602 ± 15 nm, BSA-FITC – 540 ± 12 nm) i jest rejestrowane przez kamerę cyfrową w postaci obrazów formatu TIFF. Ustawienia kamery: czas ekspozycji 400 ms, wzmocnienie sygnału pięciokrotne. Dla utrzymania stałych warunków oświetlenia źródło światła (laser) pozostał włączony przez cały wielodniowy okres eksperymentu. Aby uniknąć wyświecania składnika fluorescencyjnego próbkę naświetlano periodycznie jedynie krótkimi (0,5 s) impulsami światła generowanymi przesłoną sterowaną komputerem. Niewielką ilość światła ok. 5% skierowano na fotodiodę w celu zmierzenia aktualnej intensywności świecenia lasera. Dane z fotodiody rejestrowano w trakcie eksperymentu w celu dokonania ewentualnych korekt w przebiegu stężenia rejestrowanego w czasie. Otwarcie przysłony sprzężono z układem rejestrującym obraz i kontrolowano przy użyciu skryptu napisanego w programie MATLAB®. Układ eksperymentalny izolowano od zewnętrznych źródeł światła mogących wprowadzać zakłócenia.

Obrazy rejestrowane podczas eksperymentu przycinano do badanego obszaru a informacje o intensywności świecenia w danej odległości od materiału, zbierano do dalszej obróbki. Stwierdzono, że podczas przeprowadzanych doświadczeń, materiał umieszczony w hydrożelu nie zmieniał położenia. Największe zaobserwowane przemieszczenie w jednym z eksperymentów wynosiło 1 mm i może być pominięte. W celu określenia stężenia obu składników fluorescencyjnych, sporządzono krzywe wzorcowe (Rys. 2.10.). Czas naświetlania wybrano taki aby otrzymane wartości maksymalnej intensywności pikseli dla przypadku użycia Rodaminy B jako analogu leku, były bliskie wartości 255 dla 8 bitowej kamery.

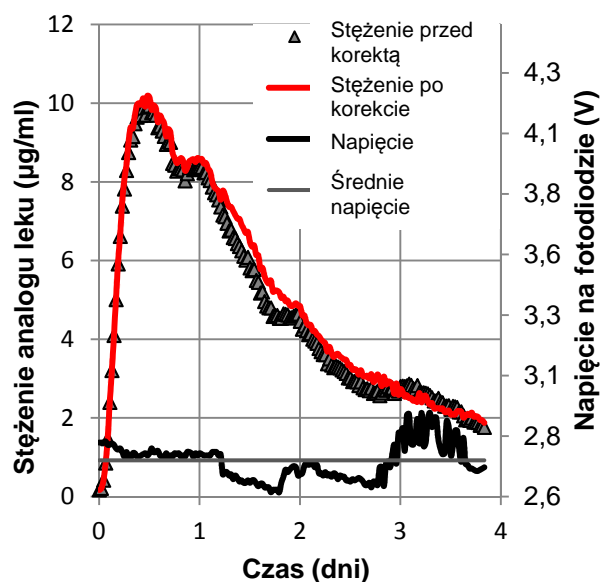


Rys. 2.9. a) Układ eksperymentalny do oceny uwalniania analogu leku z elektroprzewodzonych materiałów. b) Kontury stężenia Rodaminy B otrzymane podczas eksperymentu. Punkt P odpowiadający obszarowi 3×3 piksele w którym obliczano średnią wartość stężenia dla poszczególnych czasów eksperymentu. Wartości stężenia posłużyły do znalezienia parametrów kinetycznych modelu numerycznego c) Kontury stężenia uzyskane po dopasowaniu współczynników w modelu numerycznym.

Uzyskane wyniki pomiarów, w szczególności wartość stężenia w punkcie P w funkcji czasu, wykorzystano do walidacji modelu numerycznego procesu uwalniania leków. Przykładowy przebieg profilu stężenia rejestrowanego w czasie eksperymentu przedstawiono na Rys. 2.11. Zbierane co 5 minut dane stężenia w punkcie P przedstawiono w postaci punktów (szare trójkąty). W przebiegu profilu stężenia zauważalne są etapy w których stężenie gwałtownie spada pod wpływem fluktuacji natężenia światła lasera. Aby skorygować przebieg profilu stężenia wykorzystano dane napięcia na fotodiodzie i zarejestrowane dane stężenia przemnożono przez współczynnik korekcyjny. Skorygowane wartości stężenia w punkcie P przedstawiono czerwoną linią na Rys. 2.11.



Rys. 2.10. Krzywa wzorcowa rodamininy B (■) i BSA-FITC (▲) w hydrożelu PVA.



Rys. 2.11. Zmiana w czasie stężenia Rodamininy B (szare trójkąty) w punkcie P_1 oraz zmierzona wartość napięcia na fotodiodzie (gruba czarna linia). Szara pozioma linia to średnia wartość napięcia na fotodiodzie. Linia czerwona przedstawia skorygowaną wartość stężenia Rodamininy B po uwzględnieniu zmian natężenia lasera [125].

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

Analiza numeryczna

3.1. Model numeryczny i program obliczeniowy

Rozwiązania analityczne zagadnień uwalniania leków są dostępne jedynie dla wąskiej grupy systemów uwalniania leków charakteryzujących się prostą budową np. płaskie hydrożelowe opatrunki lub sferyczne cząstki z lekiem. Analizę numeryczną uwalniania i transportu substancji w skomplikowanych geometriach można przeprowadzić metodami elementów lub objętości skończonych (MES, MOS). Metody te polegają na sformułowaniu odpowiedniego opisu matematycznego, a następnie podzieleniu domeny (analizowanej geometrii) na elementy skończone np. trójkątne lub czworościenne elementy w przypadku odpowiednio dwuwymiarowej lub trójwymiarowej geometrii. W węzłach elementów znajdują się przybliżone rozwiązania analizowanego zjawiska fizycznego lub procesu.

W niniejszej pracy dyskretyzację układów geometrycznych ciągłych i równań różniczkowych dyfuzji, desorpcji i konwekcji wykonano metodą elementów skończonych. Jest ona jedną z szerzej stosowanych metod numerycznych, umożliwiającą rozwiązanie układu równań różniczkowych cząstkowych w złożonych geometriach o niestrukturalnej siatce obliczeniowej. Metoda ta ma najlepsze własności przybliżania rozwiązania do dokładnego w zagadnieniach wykorzystujących równania eliptyczne i paraboliczne np. równania dyfuzji, gdzie informacja o stężeniu jest dyfuzyjnie przekazywana do wszystkich sąsiadujących elementów. Rozwiązanie układów równań różniczkowych przeprowadzono w programie COMSOL Multiphysics® [126]. Jest to program komercyjny,

oparty na metodzie elementów skończonych z modułem umożliwiającym wprowadzenie przez użytkownika własnego modelu matematycznego z odpowiednimi warunkami brzegowymi i początkowymi.

Metoda elementów skończonych opiera się na sformułowaniu równania całkowego i przestrzeni funkcji aproksymujących (funkcja kształtu dla elementu i funkcje bazowe dla całego obszaru obliczeniowego). Na przykładzie równania konwekcji i dyfuzji wyrażonego równaniem:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \nabla \cdot \mathbf{v}C - \nabla \cdot (D\nabla C) = S \quad (3.1)$$

gdzie: C - stężenie składnika, \mathbf{v} - wektor prędkości płynu, D - współczynnik dyfuzji, S - źródło lub upust składnika. Dla płynu nieściśliwego $\nabla \cdot \mathbf{v} = 0$. Metodą residuów ważonych równanie (3.1) można sprowadzić do postaci sformułowania słabego [127], [128]:

$$\int_{\Omega} w \left(\frac{\partial \tilde{C}}{\partial t} + \nabla \cdot \tilde{\mathbf{v}}\tilde{C} - \nabla \cdot (D\nabla \tilde{C}) - S \right) d\mathbf{x} = \int_{\Omega} wR(\tilde{C}, \tilde{\mathbf{v}}) d\mathbf{x} \quad (3.2)$$

Równanie musi być spełnione dla funkcji testowej w zanikającej na brzegu domeny Γ . \tilde{C} - poszukiwana funkcja stężenia składnika, $\tilde{\mathbf{v}}$ - poszukiwana funkcja wektora prędkości, \mathbf{x} - wektor współrzędnych, Ω - objętość domeny. Po scałkowaniu residuum i przemnożeniu przez funkcję wagową (lub testową) otrzymujemy [127], [128]:

$$\int_{\Omega} wR(\tilde{C}, \tilde{\mathbf{v}}) d\mathbf{x} = 0 \quad (3.3)$$

Dalsze rozwinięcie sformułowania słabego (3.2) i scałkowanie przez części prowadzi do postaci [127], [128]:

$$\int_{\Omega} \left(w \frac{\partial \tilde{C}}{\partial t} + w\nabla \cdot (\tilde{\mathbf{v}}\tilde{C} - D\nabla \tilde{C}) - wS \right) d\mathbf{x} = \int_{\Gamma_N} w(\tilde{\mathbf{v}}\tilde{C} - D\nabla \tilde{C}) \cdot \mathbf{n} ds \quad (3.4)$$

gdzie \mathbf{n} - wektor normalny. Całka po powierzchni Γ_N jest całkowitym strumieniem konwekcyjnym i dyfuzyjnym w którym można wprowadzić warunek brzegowy Neumanna.

Funkcje aproksymacyjne rozwiązania dla stężenia i prędkości w elementach skończonych można zdefiniować jako kombinację liniową funkcji bazowych [127], [128]:

$$C_h = \sum_j C_j \varphi_j \quad (3.5)$$

$$v_h = \sum_j v_j \varphi_j \quad (3.6)$$

gdzie: φ - funkcja bazowa w postaci wielomianu dla danego odcinka obszaru. Wartości parametrów w węzłach j są aproksymowane pomiędzy węzłami za pomocą funkcji kształtu. Przedstawiona metoda aproksymacji rozwiązania daje możliwość wygodnej separacji zmiennych w ten sposób, że czasowa i przestrzenna zmiana funkcji C_h i v_h jest związana ze zmianą odpowiednio $C_j(t)$, $v_j(t)$ oraz $\varphi_j(\mathbf{x})$.

Aproksymację odpowiednich członów równania (3.4) przy użyciu równań (3.5, 3.6) można dokonać następująco [127], [128]:

$$\nabla C_h = \sum_j C_j \nabla \varphi_j \quad (3.7)$$

$$(\mathbf{v}C)_h = \sum_j (v_j C_j) \varphi_j \quad (3.8)$$

$$\nabla \cdot (\mathbf{v}C)_h = \sum_j C_j (v_j \cdot \nabla \varphi_j) \quad (3.9)$$

Dla przedstawionego sformułowania słabego (3.4) po podstawieniu funkcji aproksymujących otrzymujemy [127], [128]:

$$\begin{aligned} \int_{\Omega} w_h \frac{\partial C_h}{\partial t} + \int_{\Omega} w_h \nabla \cdot ((\mathbf{v}C)_h - D\nabla C_h) dx \\ = \int_{\Omega} w_h S dx - \int_{\Gamma_N} w_h ((\mathbf{v}C)_h - D\nabla C_h) \cdot \mathbf{n} ds \end{aligned} \quad (3.10)$$

W stosowanej w programie Comsol® metodzie Galerkinia [126] wykorzystujemy założenie, że funkcje testowe są takie same jak funkcje bazowe. Podstawienie równań (3.7 - 3.9) do równania (3.10) z założeniem $w_h = \varphi_j$ dla wartości w węźle u_i daje równanie [127], [128]:

$$\sum_j \left[\int_{\Omega} \varphi_i \varphi_j d\mathbf{x} \right] \frac{dC_j}{dt} + \sum_j \left[\int_{\Omega} \varphi_i \nabla \cdot [(\mathbf{v}_j \cdot \nabla \varphi_j) - (D \nabla \varphi_j)] d\mathbf{x} \right] C_j \quad (3.11)$$

$$= \int_{\Omega} \varphi_i S d\mathbf{x} - \int_{\Gamma_N} \varphi_i h d\mathbf{s}$$

gdzie $h = (\mathbf{v}C - D\nabla C) \cdot \mathbf{n}$. Układ równań (3.11) dla wszystkich węzłów obliczeniowych można zapisać w postaci macierzowej [127], [128]:

$$A \frac{dC}{dt} = BC + r \quad (3.12)$$

gdzie: $A = \{a_{ij}\}$ jest macierzą, $B = \{b_{ij}\}$, $r = \{r_i\}$ i może być również oznaczone jako [127], [128]:

$$r_i = \int_{\Omega} \varphi_i S d\mathbf{x} - \int_{\Gamma_N} \varphi_i h d\mathbf{s} \quad (3.13)$$

Poszczególne miejsca w macierzy można obliczyć z równań [127], [128]:

$$a_{ij} = \int_{\Omega} \varphi_i \varphi_j d\mathbf{x} \quad (3.14)$$

$$b_{ij} = \mathbf{c}_{ji} \cdot \mathbf{v}_j - D d_{ij} \quad (3.15)$$

gdzie:

$$\mathbf{c}_{ji} = \int_{\Omega} \varphi_j \nabla \varphi_i d\mathbf{x} \quad (3.16)$$

$$d_{ji} = \int_{\Omega} \nabla \varphi_i \cdot \nabla \varphi_j d\mathbf{x} \quad (3.17)$$

Przeprowadzenie równań do postaci słabej jest wykonywane automatycznie w programie, jednakże istnieje możliwość wprowadzania własnych równań. Autorzy programu Comsol® jako pierwsi wprowadzili sprzężenie wielu zagadnień opisywanych wg różnych modeli matematycznych. Program w sposób automatyczny tworzy siatkę obliczeniową z możliwością dokładniejszej dyskretyzacji w miejscach o przewidywanych dużych gradientach danej wielkości. W obliczeniach wybrano funkcje kształtu elementów

opisane wielomianami Lagrange'a rzędu drugiego. Ustawienia solvera obliczeniowego pozostawiono w wersji domyślnej z solverem MUMPS (*MUltifrontal Massively Parallel sparse direct Solver*). Siatkę obliczeniową zagęszczano w miejscach o dużych gradientach stężenia. Liczba stopni swobody dla poszczególnych modeli wynosiła około stu tysięcy dla modeli dwuwymiarowych do miliona w przypadku modeli trójwymiarowych.

3.2. Dyfuzja w materiałach porowatych

Zastosowany w pracy model procesu dyfuzji opiera się na pracach [129], [130] i zakłada, że spowolnienie transportu dyfuzyjnego w otoczeniu włókien zależy od porowatości materiału w którym proces transportu ma miejsce, stosunku rozmiarów dyfundującej cząsteczki i włókien. Przyjmujemy, że interakcje hydrodynamiczne cząsteczki z włóknem w roztworach polimerów oraz w żelu, traktując łańcuchy polimeru jako włókna, zmniejszają objętość dostępną dla dyfundujących cząsteczek.

Dwa efekty mają największy wpływ na szybkość dyfuzji w materiale: hydrodynamiczny F – odpowiedzialny za oddziaływania dyfundującej cząsteczki z włóknem oraz steryczny $S(f)$ – związany ze zmniejszeniem objętości wynikającym z obecności włókien. Ich wzajemny wpływ na zmniejszenie szybkości dyfuzji możemy wyrazić wzorem [130], [131]:

$$\frac{D}{D_0} = F \cdot S(f) \quad (3.18)$$

gdzie: D/D_0 - stosunek współczynników dyfuzji w płynie z włóknami i bez włókien, $f = (1 - \varepsilon)(1 + \lambda)^2$ – skorygowany ułamek objętościowy wyrażony przez porowatość materiału – ε i $\lambda = r_s/r$ – stosunek promienia dyfundującej cząsteczki leku ($r_s = k_B T / 6\pi\mu D_0$, k_B – stała Boltzmana (J/K), T – temperatura bezwzględna (K), μ - lepkość płynu (Pas)) do promienia włókna r .

Efekt hydrodynamiczny zwiększający opór tarcia dyfundującej cząsteczki w związku z obecnością włókien można opisać równaniem Brinkmana wykorzystującym przepuszczalność hydrauliczną materiału k [129]:

$$F = \left(1 + \frac{r_s}{\sqrt{k}} + \frac{1}{3} \frac{r_s^2}{k}\right)^{-1} \quad (3.19)$$

Dodatkowe informacje na temat zależności opisujących przepuszczalność w strukturach o ukierunkowanej wiązce włókien oraz przypadkowo ułożonych włóknach, czytelnik może znaleźć w pracy Stylianopoulosa i in. [132].

Dla przypadku dyfuzji prostopadłej do wiązki równoległe ułożonych włókien Perrins wyprowadził empiryczną zależność efektu sterycznego $S(f)$ wyrażoną wzorem [133]:

$$S(f) = \frac{1}{1-f} \left\{ 1 - 2f \left[1 + f - \frac{0,305827f^4}{1 - 1,402958f^8} - 0,013362f^8 \right]^{-1} \right\} \quad (3.20)$$

Efekt steryczny pomiędzy przypadkowo ułożonymi prostymi włóknami może być wyrażony równaniem [134]:

$$S(f) = e^{-0,84f^{1,09}} \quad (3.21)$$

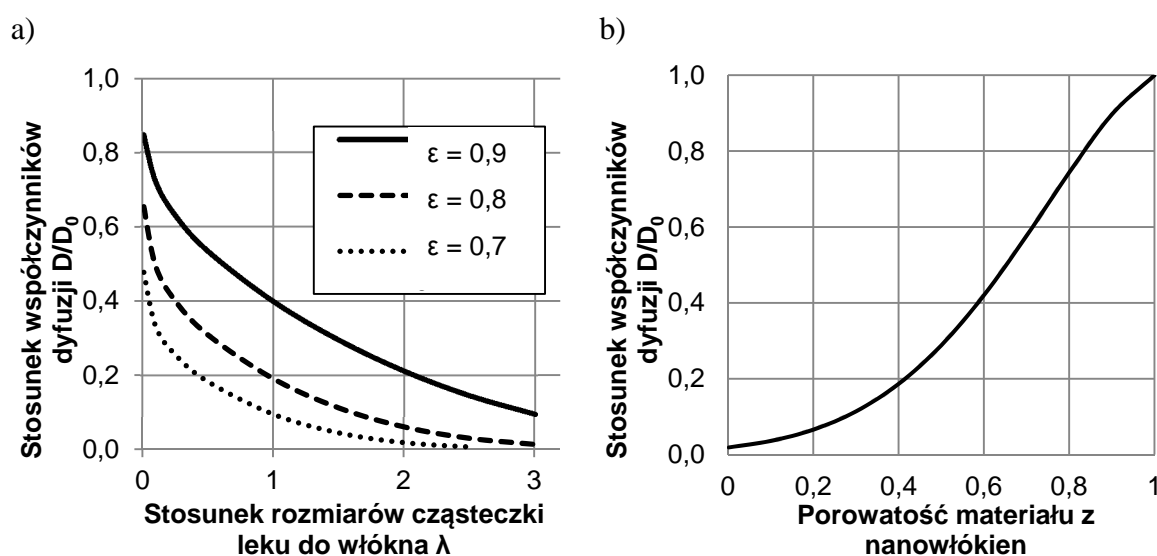
gdzie współczynniki a i b zostały dobrane przez Amsdena [135] i wynoszą: $a = \pi$, $b = 0,174 \ln\left(\frac{59,6}{\lambda}\right)$.

Półempiryczną zależność współczynnika dyfuzji w płynie od porowatości włóknistego materiału, którą wykorzystano w obliczeniach numerycznych w niniejszej pracy, można przedstawić równaniem zaproponowanym przez Clague i Phillipsa [131]. Wymienieni autorzy wyprowadzili zależność na hydrodynamiczne oddziaływania dyfundującej cząsteczki z włóknem - F , zaś efekt steryczny wynikający z obecności włókien wykorzystano z pracy [134] (równanie 3.21). W rezultacie otrzymano półempiryczną zależność opisującą dyfuzję substancji we włóknistej strukturze [131]:

$$\frac{D}{D_0} = F \cdot S(f) = e^{-a(1-\varepsilon)^b} \cdot e^{-0,84f^{1,09}} \quad (3.22)$$

Dzięki wykorzystaniu w niniejszej pracy przedstawionej zależności (3.22), uniknięto złożonych badań koniecznych do wyznaczenia parametru przepuszczalności hydraulicznej materiału k , wykorzystywanego w równaniu 3.19. Przykładowe wartości parametrów równania (3.22) dla stosowanych w doświadczeniach cząsteczek analogów leków: Rodaminy B ($r_s = 0,9$ nm) i BSA ($r_s = 3,4$ nm) oraz otrzymywanych w wyniku elektroprzędzenia włókien o rozmiarach od 0,2 do 2,5 μm zawierają się w granicach $\lambda = 0,0003 \div 0,017$, $b = 1,42 \div 2,12$.

Na rysunku 3.1 przedstawiono wpływ porowatości i rozmiarów dyfundującej cząsteczki oraz włókna na proces dyfuzji. W większości przypadków omawianych w niniejszej pracy zakres stosunku rozmiarów $\lambda = 0,0003 \div 0,017$ jest bliski zeru, stąd też obserwujemy mniejsze spowolnienie dyfuzji wynikające z obecności włókien niż w przypadku dyfuzji utrudnionej (*hindered diffusion*), gdzie rozmiar dyfundującej cząsteczki jest zbliżony lub większy od rozmiarów włókien pomiędzy którymi odbywa się transport. Z przebiegu krzywej na rysunku 3.1b zauważalny jest wpływ porowatości materiału, gdzie ze zwiększeniem objętości włókien (zmniejszeniem porowatości ε) znacząco ulega zmniejszeniu współczynnik dyfuzji cząsteczki w materiale.



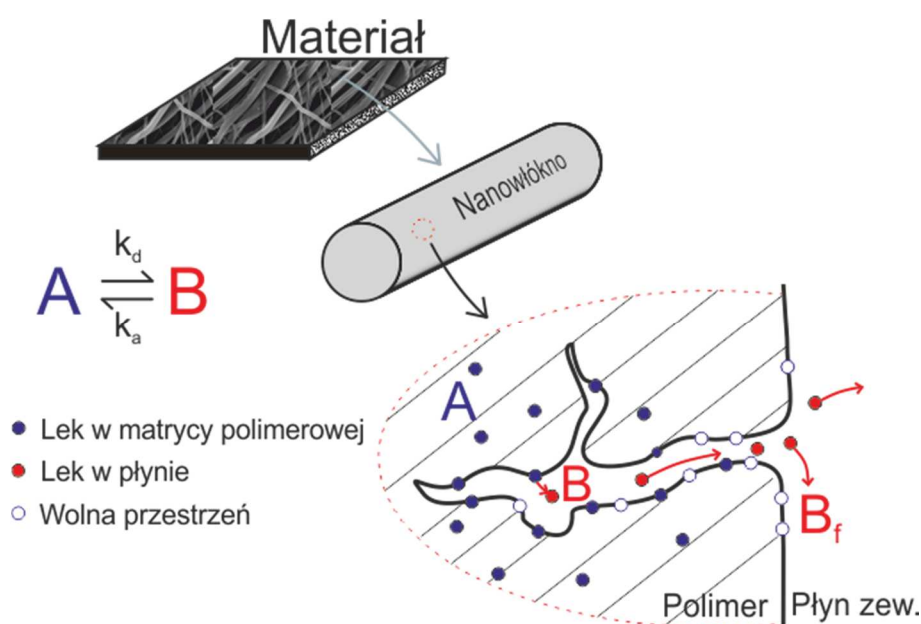
Rys. 3.1 a) Zależność współczynnika dyfuzji w materiale w funkcji stosunku rozmiarów cząsteczki leku i włókna dla różnych porowatości materiału porowatości obliczona na podstawie równania 3.22. b) Zależność współczynnika dyfuzji w materiale w funkcji jego porowatości obliczona na podstawie równania (3.22) dla podanych parametrów: $a = \pi$, $b = 2,002$, $r_s = 0,9 \text{ nm}$, $r = 1,5 \text{ }\mu\text{m}$, $\lambda = 0,0003$.

W niniejszej pracy dla dopasowywania parametrów modeli numerycznych do danych eksperymentalnych (gdzie zmianie podlegały jedynie stałe szybkości adsorpcji i desorpcji), współczynnik dyfuzji analizowanej cząsteczki leku lub analogu leku w materiale o wyznaczonej eksperymentalnie porowatości obliczano z równania (3.22) według zależności $D = D_0 \cdot F \cdot S(f)$. Wartość współczynnika dyfuzji w roztworze bez włókien – D_0 , wyznaczono eksperymentalnie opisaną w rozdziale 2.10 metodą FRAP.

3.3. Modelowanie uwalniania leków z nanowłókien

Opis procesu uwalniania leku w podejściu modeli mechanistycznych - w odróżnieniu od modeli empirycznych - opiera się na analizie fizycznych zjawisk powodujących

uwolnienie leku z matrycy polimerowej i jego transporcie w porach materiału. Jak wspomniano we wprowadzeniu, rozwinięcie powierzchni właściwej nanowłókien może być zwiększone na skutek pojawienia się nanoporowatości we włóknie. Tak duże rozwinięcie powierzchni właściwej sprawia, że uwolniona może być cała dawka leku obecna we wnętrzu nanowłókien. Całkowite uwolnienie leku z takiego materiału może sugerować, że dominującym mechanizmem uwalniania leków z nanowłókien jest dyfuzja leku w polimerze oraz dalsza dyfuzja z konwekcją w porach materiału. W większości obserwowanych przypadków, mamy jednak do czynienia z desorpcją leku z zewnętrznej powierzchni nanowłókien (w polimerach pęczniejących pod wpływem wody dyfuzja leku pomiędzy łańcuchami polimeru może być kilka rzędów wielkości szybsza niż w niepęczniejącym polimerze, dlatego w pewnych warunkach uzasadnione jest skorzystanie z modelu dyfuzji w polimerze).



Rys. 3.2. Mechanizm uwalniania leku z nanowłókien. Na rysunku wyodrębniono pojedynczy nanopor we włóknie w którym zachodzi proces desorpcji i dyfuzji.

Desorpcja leku z powierzchni nanowłókien i dyfuzja w porach materiału są kluczowymi procesami prowadzącymi do uwolnienia substancji aktywnej do otaczającego środowiska [49], [136]. Immobilizacja składnika w polimerze może zachodzić przez chemiczne przyłączenie cząsteczki leku do łańcucha polimeru lub przez fizyczne uwięzienie leku pomiędzy łańcuchami polimeru. W przypadku materiałów elektroprzewodzących z roztworów polimeru z lekiem, składnik jest immobilizowany we włóknie głównie na skutek fizycznego zablokowania pomiędzy łańcuchami polimeru zaś jego całkowite

uwolnienie nastąpi w czasie powierzchniowej lub objętościowej degradacji materiału. Stosowane w niniejszej pracy polimery cechują się wydłużonym (w stosunku do badanego czasu uwalniania rzędu 2-4 tygodni) czasem degradacji wynoszącym do dwóch lat, przez co w dalszych rozważaniach nad modelem uwalniania leków pominięto analizę procesu degradacji materiału.

3.3.1. Główne założenia modelu numerycznego

W momencie zanurzenia materiału ciecz wypełnienia pory maty i rozpoczyna się proces desorpcji i dyfuzji leku z wnętrza materiału do płynu.

Przybliżony czas τ wypełnienia nanoporów przelotowych, przez które przepływ można wyznaczyć w przybliżeniu z równań Poiseuille'a i Laplace'a jako [137]:

$$\tau \approx \frac{2 \cdot \mu \cdot L^2}{r \cdot \sigma \cdot \cos \theta} \quad (3.23)$$

gdzie: μ - dynamiczny współczynnik lepkości płynu (Pa·s), L - długość nanopora (m), r - promień nanopora (m), σ - napięcie powierzchniowe (mN/m), θ - kąt zwilżania ($^\circ$). Szacowany czas wypełnienia typowych porów o długości $L = 2,5 \mu\text{m}$ i promieniu $r = 100 \text{ nm}$, cieczą o lepkości $\mu = 0,89 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ i napięciu powierzchniowym $\sigma = 72 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$, przy założeniu $\cos \theta = 1$ wynosi $\tau = 1,6 \mu\text{s}$.

Czas wypełnienia nanoporów jednostronnie zamkniętych w początkowej fazie przebiega z taką samą szybkością jak wypełnianie nanoporów przelotowych [138]. W jednostronnie zamkniętych nanoporach ciecz zamyka pęcherzyk gazu w nanoporze i ogranicza wypełnioną objętość czynną. Jeśli pominąć absorpcję gazu do cieczy i dyfuzję gazu w cieczy, czas wypełniania nanopora można obliczyć ze zmodyfikowanego równania Washburna [138].

$$\tau = \frac{4\mu L^2}{h \sigma \cos \theta} \left\{ \frac{x^2}{2L^2(1+\alpha)} - \frac{\alpha x}{L(1+\alpha)^2} - \frac{\alpha}{(1+\alpha)^3} \ln \left[1 - (1+\alpha) \frac{x}{L} \right] \right\} \quad (3.24)$$

gdzie: μ - dynamiczny współczynnik lepkości płynu (Pa s), L - długość porów (m), h - średnica nanopora (m), σ - napięcie powierzchniowe (mN/m), θ - kąt zwilżania ($^\circ$), x - długość odcinka płynu wypełniającego nanopor (m), $\alpha = h p_0 / 2 \sigma \cos \theta$, p_0 - ciśnienie atmosferyczne (Pa). W tym modelu założono niecałkowite wypełnienie nanopora płynem z uwagi na obecność gazu. Z tego powodu w końcowym etapie długość odcinka wypełnionego cieczą – x , można obliczyć ze wzoru: $x = L/(1+\alpha)$. Czas wypełnienia

nanoporów o jednakowej szerokości i długości jak przyjęto w równaniu (3.24), lecz jednostronnie zamkniętych obliczono na $\tau = 2,4 \mu\text{s}$. Współczynnik wyrażony przez stosunek ciśnienia atmosferycznego oraz Laplace'a wynosi $\alpha = 0,145$, zaś maksymalne wypełnienie nanopora o długości $L = 2,5 \mu\text{m}$ wynosi $L_{\text{max}} = 2,18 \mu\text{m}$. Czas ten jest półtora razy większy niż w przypadku wypełniania nanoporów przelotowych, jednakże należy zauważyć iż część nanopora ($L - L_{\text{max}}$) jest wypełniona gazem, który uniemożliwia dostęp cieczy [138].

Rozważając absorpcję uwięzionego w nanoporze gazu do cieczy, podczas której następuje powolne usuwanie gazu z nanopora i dalsze jego wypełnianie cieczą, Phan i in. [138] zaproponowali rozwiązanie układu równań do wyznaczenia zmiany masy gazu w układzie eksperymentalnym zawierającym nanopory o przekroju prostokątnym:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= \frac{h}{12\mu x} \left[2\sigma \cos \theta - \frac{R \cdot T}{Mw} \left(\frac{m}{L-x} - \frac{m_0}{L} \right) \right] \\ \frac{dm}{dt} &= \frac{D_d RT k_h}{x(L-x)L} [mL - m_0(L-x)] \end{aligned} \quad (3.25)$$

gdzie: h - wysokość nanopora (m), w - szerokość nanopora (m), x - długość odcinka płynu wypełniającego nanopor (m), μ - dynamiczny współczynnik lepkości płynu (Pa·s), σ - napięcie powierzchniowe (mN/m), R - stała gazowa (J/mol·K), T - temperatura bezwzględna (K), m - masa gazu obecna w nanoporze (kg), L - długość nanopora (m), m_0 - masa początkowa gazu (kg); $m_0 = p_0 M h w L / (RT)$, p_0 - ciśnienie atmosferyczne (Pa), M - masa molowa gazu (kg/mol), D_d - współczynnik dyfuzji gazu w cieczy (m^2/s), k_h - stała Henry'ego (Pa).

Obliczony w niniejszej pracy czas wypełniania porów materiału i nanoporów we włóknie cieczą $\tau = 1,6 - 2,4 \mu\text{s}$ jest znacznie krótszy od czasu uwalniania leku i z uwagi na brak wpływu na profil uwalniania leku, można go pominąć w modelu numerycznym.

Po procesie wypełniania nanoporów cieczą, następuje proces desorpcji leku z powierzchni nanowłókien, dyfuzji w nanoporach i porach materiału. W założeniach pominięto wpływ stężenia leku na współczynnik dyfuzji leku w płynie.

W niniejszym modelu przyjęto też dodatkowe założenia:

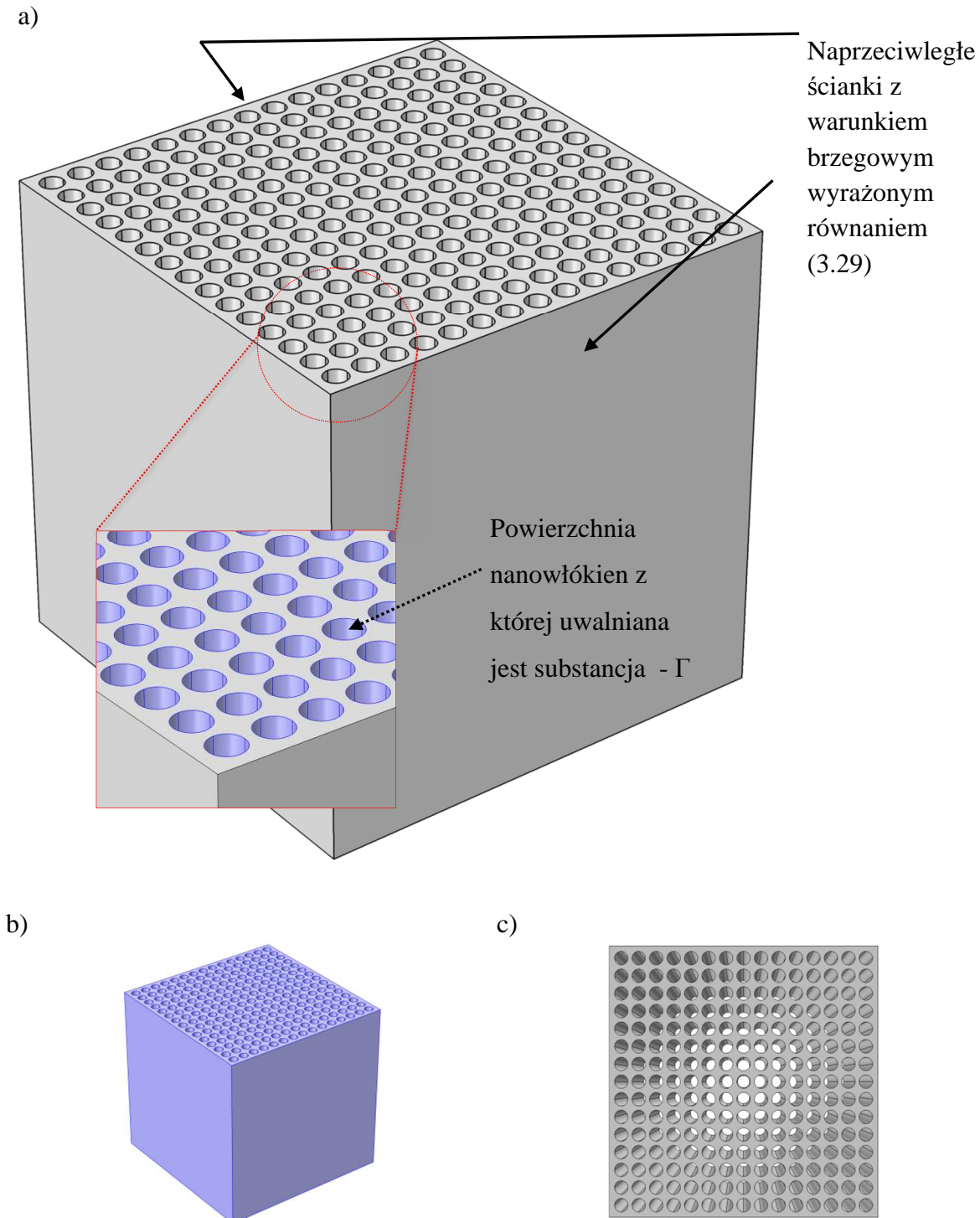
- niezmienny w czasie kształt geometrii maty (brak efektów degradacji i pęcznienia w analizowanym czasie uwalniania),
- stała porowatość maty,
- homogeniczne rozmieszczenie leku na powierzchni włókien,

- maksymalne stężenie leku na powierzchni odpowiada całkowitemu pokryciu powierzchni materiału monowarstwą leku,
- współczynnik dyfuzji w płynie zależy od porowatości maty (wyznaczany z równania 3.22 dla geometrii o zadanej porowatości),
- dyfuzja opisana prawem Ficka.

Dodatkowe założenia i uproszczenia omówiono poniżej podczas dokładniejszego opisu modeli mikroskopowych (uproszczonego i rozszerzonego) oraz modelu makroskopowego.

3.3.2. Model mikroskopowy - podstawowy

W poniższym modelu rozważany jest nieustalony proces desorpcji z powierzchni włókien - Γ i dyfuzji w porach materiału - Ω . Domena obliczeniowa modelu wykorzystuje geometrię sześcienną o wymiarze boku $L = 100 \mu\text{m}$, w której umieszczono 225 prostych włókien w charakterystycznych konfiguracjach: regularnej (włókna rozstawione równoległe do siebie, w równych odstępach), nieregularnej (włókna umieszczone w geometrii pod różnym kątem, w różnorodnych odstępach). W celu przedstawienia modelu mikroskopowego dla wybranych parametrów, w tym rozdziale pokazano jedynie geometrię o regularnie ułożonych 225 włóknach (Rys. 3.3). Zakładamy, że przedstawiona geometria, będąca komórką elementarną, posiada identyczną charakterystykę włókien (rozmiar, ukierunkowanie) w pozostałej części materiału. Komórka obliczeniowa stanowi element reprezentujący nieskończoną matę o stałej grubości. Wymiar boku sześcianu obliczeniowego odpowiada średniej grubości rzeczywistych materiałów otrzymywanych w procesie elektroprzędzenia. W podstawowym mikroskopowym modelu uwalniania, pominięto procesy zachodzące we wnętrzu nanowłókna, przyjmując iż proces sorpcji zachodzi wyłącznie na zewnętrznej powierzchni włókien.



Rys. 3.3. a) Geometria komórki elementarnej z regularnie ułożonymi włóknami. Powiększenie przedstawiające powierzchnię nanowłókien - Γ , z której uwalniana jest lek. Czarnymi strzałkami zaznaczono ścianki domeny z warunkiem brzegowym kontaktu z płynem odbierającym substancję aktywną. Na pozostałych czterech zewnętrznych ściankach domeny zastosowano warunek brzegowy symetrii. b) Objętość porów między włóknami komórki elementarnej - Ω . c) Widok z góry komórki elementarnej przedstawiający geometrię po wycięciu włókien z domeny obliczeniowej.

3.3.2.1. Założenia podstawowego modelu mikroskopowego

Zmianę stężenia składnika zaadsorbowanego na powierzchni włókien opisano równaniem różniczkowym zawierającym człon adsorpcji i desorpcji (3.26). Adsorpcję wyrażono jako dwucząsteczkową reakcję pomiędzy wolnym centrum adsorpcji na powierzchni materiału $C_A^{\max} - C_A$ i wolną cząsteczką składnika C_B (gdzie C_A^{\max} to maksymalne stężenie składnika na powierzchni materiału dla którego powierzchnia porów pokryta jest monowarstwą składnika). Współczynnikiem proporcjonalności jest współczynnik adsorpcji k_a ($\text{m}^3/\text{kg}\cdot\text{s}$). Desorpcję wyrażono jako jednocząsteczkową reakcję o współczynniku desorpcji k_d (1/s). Ostatecznie, zmianę stężenia na powierzchni włókien opisano równaniem [103], [104], [139]–[141]:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = k_a C_B (C_A^{\max} - C_A) - k_d C_A \quad (3.26)$$

Czasoprzestrzenny rozkład stężenia składnika w płynie otaczającym włókna jest opisany II prawem Ficka z członem źródłowym będącym strumieniem substancji z powierzchni włókien:

$$\frac{\partial C_B}{\partial t} = D_B \left(\frac{\partial^2 C_B}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_B}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_B}{\partial z^2} \right) - \rho_p [k_a C_B (C_A^{\max} - C_A) - k_d C_A] \quad (3.27)$$

gdzie: D_B – współczynnik dyfuzji substancji w płynie otaczającym włókna, ρ_p – gęstość właściwa polimeru (wartość dla polimeru PLC wynosi 1170 kg/m^3).

3.3.2.2. Warunki brzegowe i początkowe

Na czterech ściankach zewnętrznych sześcianu, graniczących z jednakowymi komórkami elementarnymi reprezentującymi materiał, zastosowano warunek symetrii w kierunku normalnym do powierzchni ścianek:

$$D_B \nabla C_B \cdot \vec{n} = 0 \quad (3.28)$$

W przedstawionym modelu zastosowano warunek brzegowy dyfuzyjnego transportu masy z materiału do otaczającego płynu. Na dwóch przeciwległych ściankach sześcianu warunek brzegowy kontaktu z płynem przedstawiono równaniem:

$$N_S = k_c^{\text{out}} (C_B - C_B^{\text{out}}) \quad (3.29)$$

gdzie: k_c^{out} – współczynnik transportu masy do płynu otaczającego materiał (m/s), C_B^{out} – stężenie w płynie otaczającym materiał wynoszące $C_B^{out} = 0$ kg/m³.

Współczynnik transportu masy wyrażono jako $k_c^{out} = D_B/\delta$, gdzie δ to grubość hipotetycznej warstewki dyfuzyjnej. Z uwagi na brak metod eksperymentalnych pozwalających zmierzyć grubość tejże warstewki, jej wartość umownie przyjęto jako $\delta = 0,001$ m. Dla typowych wartości współczynnika dyfuzji D_B wynoszących $D_B = 1 \cdot 10^{-11}$ m²/s, współczynnik transportu masy wyniesie $k_c^{out} = 1 \cdot 10^{-8}$ m/s. Niska wartość współczynnika transportu masy przez barierę dyfuzyjną oznacza zwiększony opór transportu składnika przez granicę materiał - płyn i akumulację niezwiązanej postaci składnika w materiale. Warunek ten można również zastosować w przypadku kontaktu materiału z powierzchnią tkanki, gdzie przenikanie substancji przez powierzchnię styku, z uwagi na opór transportu masy, może być wolniejsze niż bierny transport dyfuzyjny.

Przyjęto, że stężenie początkowe składnika w płynie wynosi $C_{B0} = 1$ kg/m³, zaś na powierzchni włókien stężenie odniesione do masy materiału polimerowego wynosi $C_{A0} = 0,01$ kg składnika/kg materiału, co jest standardową wartością używaną w eksperymentach.

Masę składnika obecnego w materiale w czasie t obliczono z równania:

$$M_t = \int_{\Gamma} \frac{\rho_p}{a} C_A d\Gamma + \int_{\Omega} C_B d\Omega \quad (3.30)$$

gdzie: Γ – całkowita powierzchnia włókien, Ω – objętość płynu pomiędzy włóknami, ρ_p – gęstość polimeru, a - powierzchnia właściwa włókien obliczona dla wytworzonej geometrii (m²/m³).

Kumulatywną masę uwolnionego składnika po czasie t , odniesioną do początkowej masy składnika w materiale obliczono ze wzoru:

$$R(t) = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \quad (3.31)$$

gdzie: M_0 – masa składnika w materiale w chwili początkowej $t = 0$ s.

3.3.2.3. Analiza bezwymiarowa

Dla ułatwienia analizy procesu uwalniania, wprowadzono parametry bezwymiarowe. Stężenia składnika w postaci zaadsorbowanej i niezwiązanej odniesiono do stężeń początkowych składnika:

$$A = \frac{C_A}{C_{A0}}, B = \frac{C_B}{C_{B0}} \quad (3.32)$$

Współrzędne w kartezjańskim układzie współrzędnych odniesiono do średnicy włókna L:

$$X = \frac{x}{L}, Y = \frac{y}{L}, Z = \frac{z}{L} \quad (3.33)$$

Czas dyfuzji składnika w płynie wybrano jako skalę czasu, dzięki czemu bezwymiarowy czas wyrażono wzorem:

$$\tau = \frac{D_B t}{L^2} \quad (3.34)$$

Po podstawieniu parametrów bezwymiarowych do równań (3.26) - (3.27) otrzymujemy zmodyfikowany układ równań zmiany bezwymiarowego stężenia składników:

$$\frac{\partial A}{\partial \tau} = \frac{k_d L^2}{D_B} \left[\frac{k_a}{k_d} C_{B0} (A^{\max} - A) B - A \right] \quad (3.35)$$

$$\frac{\partial B}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 B}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Z^2} + \rho_p \frac{C_{A0} k_d L^2}{C_{B0} D_B} \left[\frac{k_a}{k_d} C_{B0} (A^{\max} - A) B - A \right] \quad (3.36)$$

Warunek symetrii na czterech ściankach w postaci bezwymiarowej sprowadzono do postaci:

$$\nabla B \cdot \vec{n} = 0 \quad (3.37)$$

Warunek brzegowy kontaktu z płynem otaczającym materiał dany jest wzorem:

$$N_S = \frac{k_c^{\text{out}} \cdot L}{D_B} (B - B^{\text{out}}) \quad (3.38)$$

gdzie $B^{\text{out}} = 0$.

Bezwymiarowe stężenie początkowe składnika na włóknach wynosi $A(\tau=0) = A^{\max} = 1$, zaś bezwymiarowe stężenie początkowe składnika w porach materiału $B(\tau=0) = 0$.

W powyższych równaniach wyróżniono bezwymiarowe liczby kryterialne. Liczba Damköhlera (Da) wyraża stosunek czasu dyfuzji do czasu desorpcji, zaś liczba Sherwooda (Sh) wyraża stosunek konwekcyjnego i dyfuzyjnego transportu składnika:

$$Da = \frac{k_d L^2}{D_B} \quad (3.39)$$

$$Sh = \frac{k_c^{out} L}{D_B} \quad (3.40)$$

Stałą równowagi procesu adsorpcji - desorpcji wyrażono w postaci:

$$K = C_{B0} \frac{k_a}{k_d} \quad (3.41)$$

Dodatkowo, w równaniu (3.36) wyróżniono parametr uwzględniający stosunek początkowych stężeń składnika i gęstości:

$$C_0 = \rho_p \frac{C_{A0}}{C_{B0}} \quad (3.42)$$

Po podstawieniu do równań (3.35) - (3.36) otrzymujemy ostatecznie uproszczony układ równań:

$$\frac{\partial A}{\partial \tau} = Da[K(A^{\max} - A)B - A] \quad (3.43)$$

$$\frac{\partial B}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 B}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Z^2} + C_0 Da[K(A^{\max} - A)B - A] \quad (3.44)$$

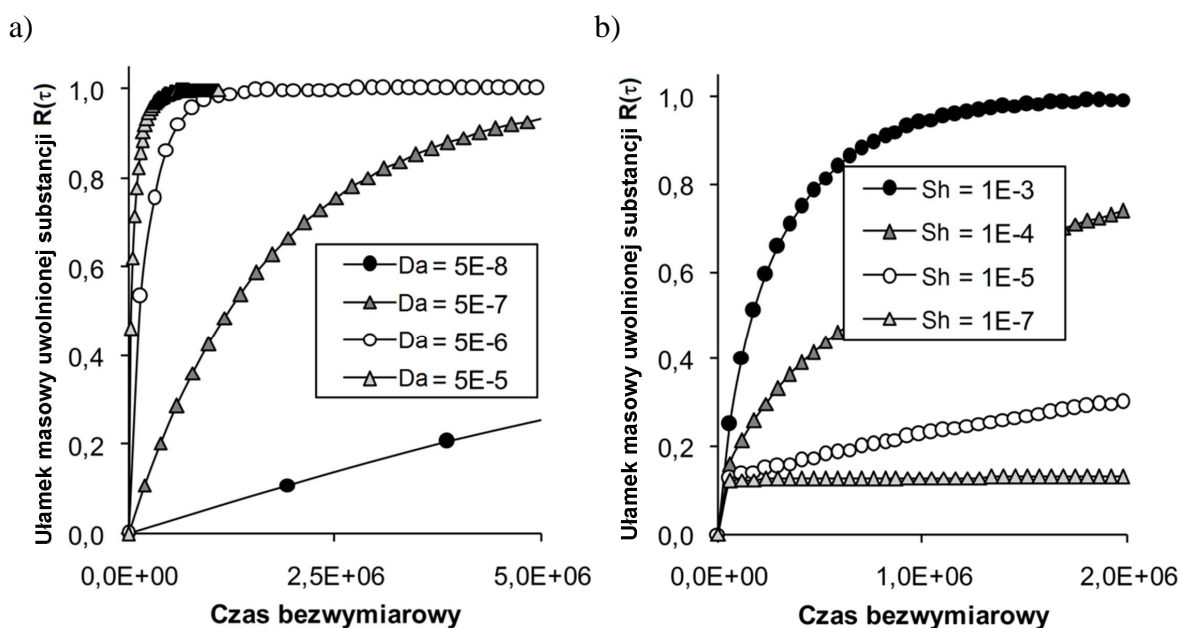
3.3.2.4. Rozwiązanie modelu matematycznego

Analizę numeryczną wpływu poszczególnych parametrów na szybkość uwalniania składnika z materiału wykonano dla zakresów parametrów przedstawionych w tabeli 3.1. Wartości parametrów zostały przyjęte na podstawie danych doświadczalnych i literaturowych.

Tab. 3.1. Zakresy parametrów zastosowane w obliczeniach.

Da	Sh	C ₀	K
$5 \cdot 10^{-8} - 5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	$1,17 - 5,85 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^1$

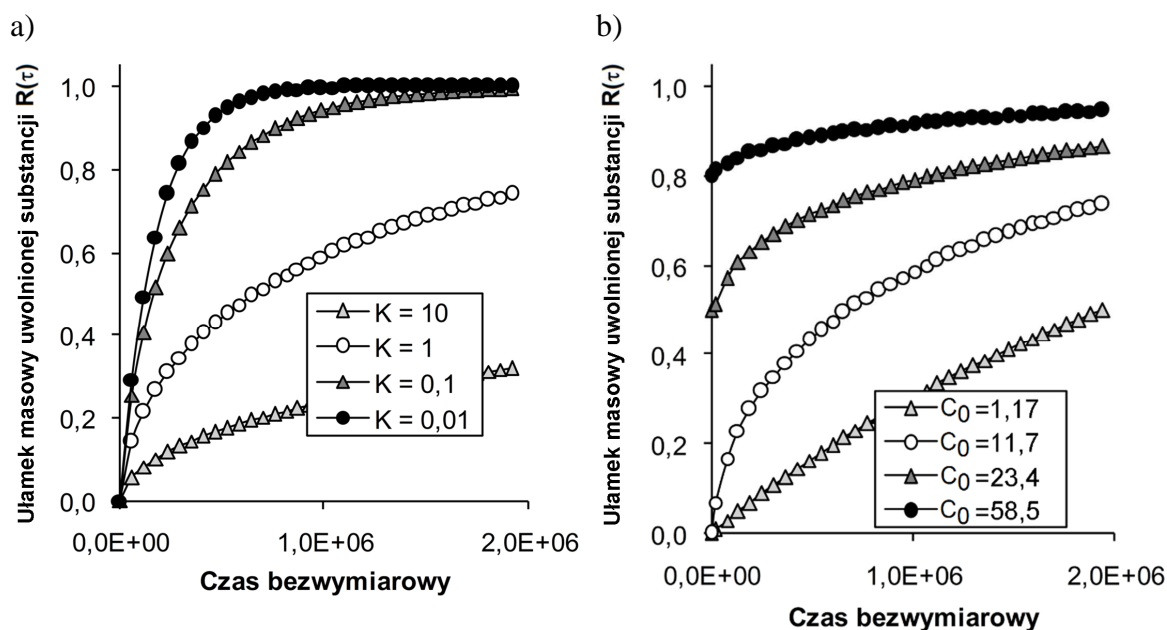
Na rysunku 3.4a przedstawiono wpływ liczby Damköhlera na szybkość uwalniania substancji. Wzrost liczby Damköhlera a tym samym szybkości desorpcji składnika z powierzchni powoduje znaczący wzrost szybkości uwalniania i osiągnięcie całkowitego uwolnienia składnika w krótszym czasie. Wyniki symulacji numerycznych przedstawiające wpływ liczby Sherwooda na szybkość uwalniania substancji przedstawiono na rysunku 3.4b. Wzrost oporu transportu przez barierę materiał - płyn, odwrotnie proporcjonalnego do współczynnika transportu masy, powoduje zahamowanie uwalniania składnika z materiału i jego akumulację w materiale.



Rys. 3.4. a) Wpływ liczby Damköhlera na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Sh = 1 \cdot 10^{-4}$, $C_0 = 1,17$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$. b) Wpływ liczby Sherwooda na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 5 \cdot 10^{-7}$, $C_0 = 1,17$, $K = 1$.

Na rysunku 3.5a zaprezentowano wpływ równowagi sorpcyjnej na szybkość uwalniania substancji. Wzrost szybkości adsorpcji składnika na powierzchni powoduje spadek szybkości uwalniania. Przykładowo dla $K = 1$ i $K = 10$, po tym samym czasie zanotowano dwukrotny spadek ilości uwolnionej substancji. Wpływ stężenia początkowego substancji na szybkość uwalniania przedstawiono na rysunku 3.5b. Można zaobserwować iż

dwukrotne zwiększenie stężenia składnika na powierzchni włókien spowodowało 50% początkowy wzrost uwalnianej substancji.



Rys. 3.5. a) Wpływ równowagi sorpcji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 5 \cdot 10^{-7}$, $Sh = 1 \cdot 10^{-4}$, $C_0 = 1,17$. b) Wpływ stężenia początkowego C_0 na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 5 \cdot 10^{-7}$, $Sh = 1 \cdot 10^{-4}$, $K = 1$.

Przedstawiony model został wykorzystany w dalszej części pracy do obliczenia współczynników kinetycznych dla danych eksperymentalnych. Otrzymany eksperymentalnie profil uwalniania składnika został wprowadzony do programu obliczeniowego. Następnie dobierano współczynniki k_a i k_d w ten sposób, aby różnica w przebiegu profilu eksperymentalnego i numerycznego była jak najmniejsza.

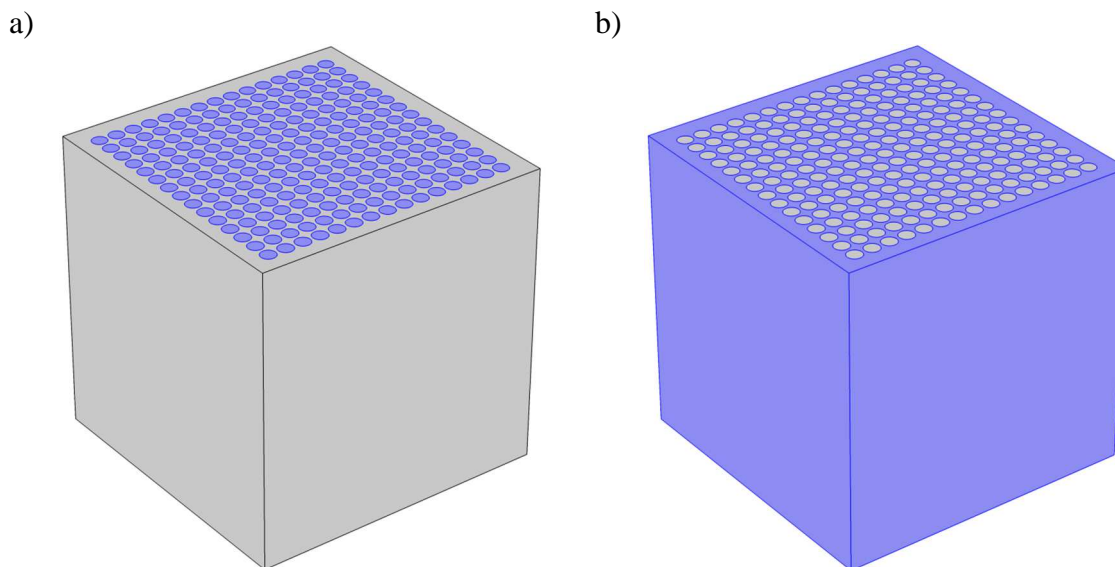
Model został również użyty w badaniu wpływu konfiguracji włókien na szybkość uwalniania substancji z powierzchni włókien. Wyniki tych badań przedstawiono w podrozdziale 4.3.3.

3.3.3. Model mikroskopowy - rozszerzony

W ramach udoskonalania modelu uwalniania leku z włókien, zaproponowano bardziej szczegółowe podejście do opisu procesu desorpcji - adsorpcji na powierzchni włókien i dyfuzji w płynie otaczającym włókna. W pierwszym modelu (podstawowym) przyjęto założenie, że procesy sorpcji składnika zachodzą wyłącznie na zewnętrznej powierzchni włókien (we wnętrzu włókien nie występowały procesy transportu i wymiany masy). Zaproponowany model podstawowy jest uzasadniony dla wielu przypadków w których otrzymano materiały nie posiadające nanoporów. Wyniki badań mikroskopii elektronowej nanowłókien wskazują jednak na konieczność rozwinięcia powierzchni właściwej procesu adsorpcji-desorpcji z racji obecności nanoporów we wnętrzu włókien [47], [49]. Z tego powodu postanowiono rozszerzyć istniejący model uwzględniając nanoporowatość włókien i procesy zachodzące we wnętrzu nanoporów. Nanopory we włóknach mają niejednorodny rozmiar i dodatkowo mogą mieć różną strukturę. Dużą rolę w transporcie składnika może zatem odgrywać spowolniona dyfuzja cząsteczek substancji w ich wnętrzu. Rozszerzenie modelu o dyfuzję w nanoporach włókna oraz przenikanie substancji z objętości nanoporów do płynu otaczającego włókno, może pomóc w dokładniejszym opisie uwalniania leków. W porównaniu do modelu podstawowego uwzględnienie rzeczywistej geometrii nanoporów, istotnie zwiększa stopień komplikacji modelu numerycznego. Stąd też jedynie rozszerzono model o dyfuzję składnika we wnętrzu włókien opierając się na efektywnych parametrach transportu składnika.

3.3.3.1. Założenia rozszerzonego modelu mikroskopowego

W poniższym modelu analizowany składnik występujący w różnych postaciach (zaadsorbowanej oraz niezwiązanej) oznaczono odpowiednimi symbolami. Stężenie składnika zaadsorbowanego na ściankach nanoporów wewnątrz nanowłókien oznaczono symbolem C_A (kg składnika/kg polimeru). Ten niemobilny składnik związany jest z polimerem, a jego uwolnienie do płynu następuje z szybkością k_d (równanie 3.45). Stężenie zaadsorbowanego składnika wyrażono w jednostkach masy składnika na masę polimeru. Stężenie składnika w postaci niezwiązanej, mogącej dyfundować w nanoporach oznaczono jako C_B (kg/m³). Wartość współczynnika dyfuzji w nanoporach dobrana została z danych literaturowych dla cząsteczek o podobnej masie molowej [18]. Dla odróżnienia niezwiązanej postaci składnika we włóknie, stężenie składnika w płynie otaczającym włókna wyrażono symbolem C_{Bf} (kg/m³).



Rys. 3.6. Komórka elementarna składająca się z dwóch domen: a) włókien Ω_1 i b) przestrzeni między włóknami Ω_2 .

Równanie opisujące proces sorpcji na powierzchni nanoporów (domena włókien Ω_1) wyrażone przez odpowiednie stałe szybkości adsorpcji i desorpcji [103], [104], [139]–[141]:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = k_a C_B (C_A^{\max} - C_A) - k_d C_A \quad (3.45)$$

gdzie: k_a , k_d – współczynnik adsorpcji i desorpcji składnika na powierzchni włókna (odpowiednio 1/s, $m^3/kg \cdot s$), C_A^{\max} – stężenie maksymalne składnika, przy którym następuje wysycenie centrów adsorpcji i nie następuje dalszy proces zapełniania powierzchni substancją aktywną (kg składnika/kg polimeru).

Proces dyfuzji wewnątrz nanoporów włókna (domena Ω_1) wraz z członem źródłowym adsorpcji - desorpcji opisano równaniem:

$$\varepsilon_w \frac{\partial C_B}{\partial t} = \varepsilon_w D_B \left(\frac{\partial^2 C_B}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_B}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_B}{\partial z^2} \right) - \rho_p (1 - \varepsilon_w) \frac{\partial C_A}{\partial t} \quad (3.46)$$

gdzie: ε_w – porowatość wewnętrzna włókna (wartość estymowana), D_B – współczynnik dyfuzji efektywnej w nanoporach włókien (wartość przyjęta z literatury) (m^2/s), x, y, z – współrzędne w kartezjańskim układzie współrzędnych (m), ρ_p – gęstość polimeru (kg/m^3).

Dyfuzja składnika w płynie otaczającym włókna (domena Ω_2) wyrażona jest równaniem Ficka:

$$\frac{\partial C_{Bf}}{\partial t} = D_{Bf} \left(\frac{\partial^2 C_{Bf}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{Bf}}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_{Bf}}{\partial z^2} \right) \quad (3.47)$$

3.3.3.2. Warunki brzegowe i początkowe

Strumień masy składnika z włókien do objętości porów przez powierzchnię graniczną włókno - płyn wynosi:

$$N_B = N_{Bf} = -k_c(C_B^{pow} - C_B) = k_c(C_{Bf}^{pow} - C_{Bf}) \quad (3.48)$$

gdzie: C_B^{pow} , C_{Bf}^{pow} to stężenia składnika na powierzchni (kg/m^3), k_c - współczynnik transportu masy przez powierzchnię włókno - płyn (m/s).

Na czterech ściankach zewnętrznych sześcianu, graniczących z jednakowymi komórkami elementarnymi reprezentującymi materiał, zastosowano warunek symetrii w kierunku normalnym do powierzchni ścianek:

$$D_{Bf} \nabla C_{Bf} \cdot \vec{n} = 0 \quad (3.49)$$

Na dwóch przeciwległych ściankach sześcianu warunek brzegowy kontaktu z płynem przedstawiono równaniem:

$$N_S = k_c^{out}(C_{Bf} - C_{Bf}^{out}) \quad (3.50)$$

gdzie: k_c^{out} – współczynnik transportu masy z komórki elementarnej (m/s), C_{Bf}^{out} – stężenie w płynie otaczającym materiał wynoszące $C_{Bf}^{out} = 0 \text{ kg/m}^3$.

Warunek początkowy stężenia niezwiązanej postaci składnika w płynie wypełniającym nanopory oraz pory materiału wynosi $C_{B0} = C_{Bf0} = 1 \text{ kg/m}^3$, zaś stężenie początkowe zaadsorbowanej postaci składnika na powierzchni włókien $C_{A0} = 0,01 \text{ kg}$ składnika/kg polimeru.

Masę składnika obecnego w materiale w czasie t do wyznaczenia kumulatywnej masy składnika (3.31), obliczono z równania:

$$M_t = \int_{\Omega_1} \rho_p C_A d\Omega_1 + \int_{\Omega_1} C_B d\Omega_1 + \int_{\Omega_2} C_{Bf} d\Omega_2 \quad (3.51)$$

gdzie: Ω_1 – objętość włókien, Ω_2 – objętość płynu pomiędzy włóknami.

3.3.3.3. Analiza bezwymiarowa

Podobnie jak w poprzednim przypadku, stężenia składnika w postaci zaadsorbowanej i niezwiązanej odniesiono do stężeń początkowych (3.32). Współrzędne

w kartezjańskim układzie współrzędnych odniesiono do średnicy włókna L , zaś czas dyfuzji składnika w porach materiału odniesiono jako skalę czasu dla rozpatrywanego procesu.

Po podstawieniu parametrów bezwymiarowych do równań (3.45) - (3.47) otrzymujemy układ równań:

$$\frac{\partial A}{\partial \tau} = \frac{k_d L^2}{D_{Bf}} \left[\frac{k_a}{k_d} C_{B0} (A^{\max} - A) B - A \right] \quad (3.52)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial B}{\partial \tau} = \frac{D_B}{D_{Bf}} \left(\frac{\partial^2 B_f}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B_f}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2 B_f}{\partial Z^2} \right) \\ - \rho_p \frac{C_{A0}}{C_{B0}} \frac{(1 - \varepsilon_w)}{\varepsilon_w} \frac{k_d L^2}{D_{Bf}} \left[\frac{k_a}{k_d} C_{B0} (A^{\max} - A) B - A \right] \end{aligned} \quad (3.53)$$

$$\frac{\partial B_f}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 B_f}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B_f}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2 B_f}{\partial Z^2} \quad (3.54)$$

Warunek brzegowy strumienia przez powierzchnię włókna:

$$N_B = N_{Bf} = - \frac{k_c \cdot L}{D_{Bf}} C_{B0} (B - B^{\text{pow}}) = \frac{k_c \cdot L}{D_{Bf}} C_{Bf0} (B_f^{\text{pow}} - B_f) \quad (3.55)$$

Warunek symetrii na czterech ściankach komórki elementarnej:

$$\nabla B_f \cdot \vec{n} = 0 \quad (3.56)$$

Warunek brzegowy kontaktu z płynem otaczającym materiał:

$$N_S = \frac{k_c^{\text{out}} L}{D_{Bf}} (B_f - B_f^{\text{out}}) \quad (3.57)$$

Bezwymiarowe stężenie początkowe składnika we włóknach wynosi $A = 1$, zaś bezwymiarowe stężenie początkowe składnika w porach materiału $B = 0$.

Podobnie jak w modelu podstawowym, w powyższych równaniach wyróżniono liczbę kryterialną Damköhlera, liczbę Sherwooda dla przejścia składnika z domeny włókna do otaczającego go płynu - Sh_1 oraz z płynu w porach komórki elementarnej do otoczenia - Sh_2 . Wyróżniono także stałą równowagi procesu adsorpcji - desorpcji - K , parametr uwzględniający porowatość wewnętrzną nanowłókna - $E = (1 - \varepsilon_w)/\varepsilon_w$; oraz parametr uwzględniający stosunek początkowych stężeń i gęstości nośnika leku - C_0 (3.42).

Bezwymiarowy współczynnik dyfuzji składnika wyrażono wzorem:

$$D = \frac{D_B}{D_{Bf}} \quad (3.58)$$

Po podstawieniu do równań (3.52) - (3.54) otrzymujemy zmodyfikowany układ równań:

$$\frac{\partial A}{\partial \tau} = Da [K (A^{\max} - A)B - A] \quad (3.59)$$

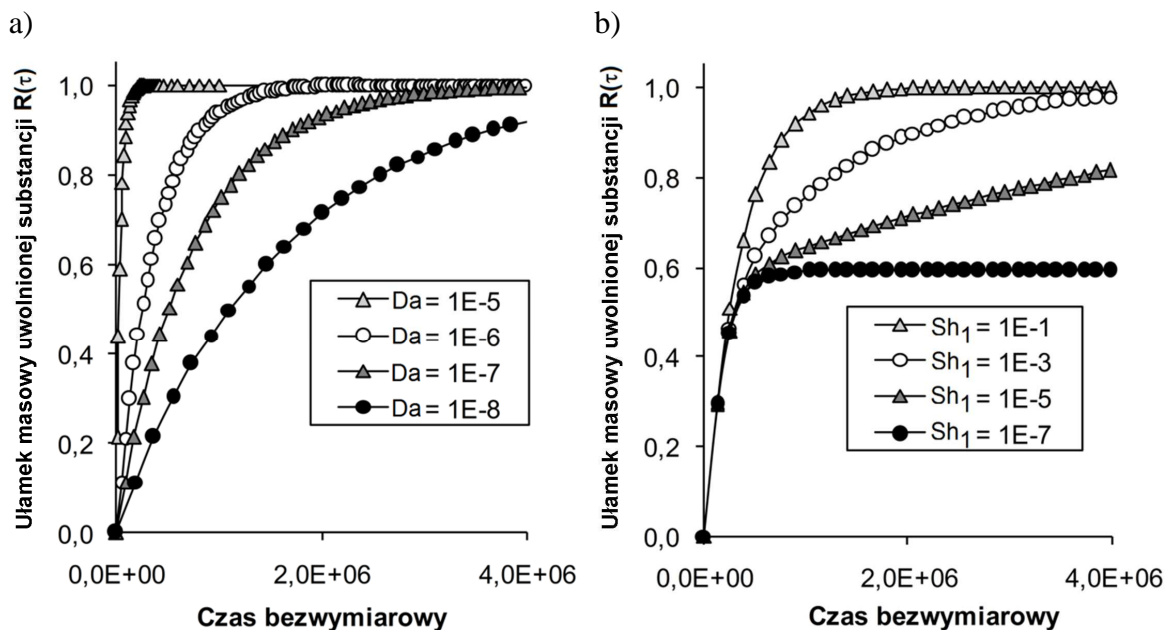
$$\frac{\partial B}{\partial \tau} = D \left(\frac{\partial^2 B}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Z^2} \right) + C_0 E Da [K (A^{\max} - A) B - A] \quad (3.60)$$

$$\frac{\partial B_f}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 B_f}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B_f}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2 B_f}{\partial Z^2} \quad (3.61)$$

3.3.3.4. Rozwiązanie modelu matematycznego

Obliczenia wpływu poszczególnych parametrów na szybkość uwalniania składnika z materiału wykonano dla parametrów przedstawionych w tabeli 3.2.

Zwiększenie szybkości desorpcji powoduje zwiększenie szybkości uwalniania składnika z materiału. Dla liczby Damköhlera równej $1 \cdot 10^{-8}$ zaobserwowano szybkie przejście zaadsorbowanej postaci leku w postać wolną i uwolnienie z objętości materiału (Rys. 3.7a). Akumulacja niezwiązanej postaci składnika we włóknach spowodowana zwiększeniem oporów przenikania przez granicę włókno - otaczający płyn zahamowała proces desorpcji z włókien (Rys. 3.7b).

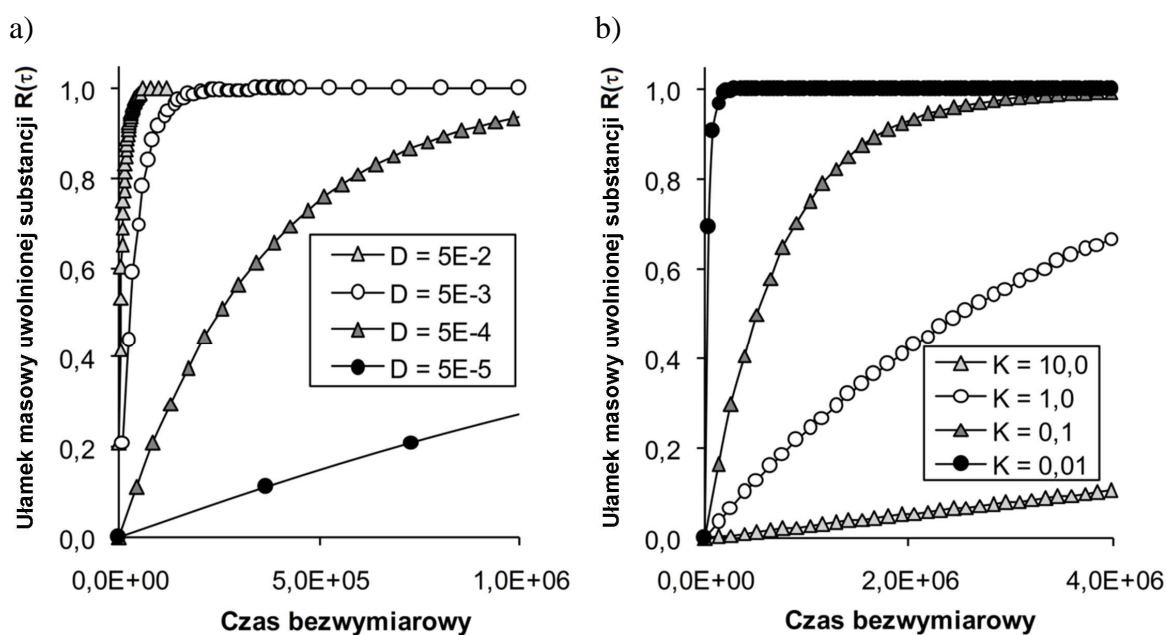


Rys. 3.7. a) Wpływ liczby Damköhlera na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-3}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$ b) Wpływ oporu przenikania składnika z włókna do otaczającego płynu na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$.

Tab. 3.2. Zakresy parametrów zastosowane w obliczeniach.

Da	Sh₁	Sh₂	D
$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-2}$
K	E	C₀	
$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^1$	$8.5 \cdot 10^{-3} - 3$	$1,17 \cdot 10^1 - 1,75 \cdot 10^2$	

Zwiększenie wartości współczynnika dyfuzji składnika w porach włókien może przyspieszyć uwolnienie substancji z materiału (Rys. 3.8a). Tym samym zwiększenie np. temperatury w jakiej uwalniana jest substancja przyspieszy transport składnika w porach włókien oraz porach materiału, sumarycznie prowadząc do możliwego wyrzutu substancji z materiału. Do podobnej sytuacji może dojść w wyniku zastosowania innego nośnika leku lub konwekcji wymuszonej w ośrodku z zanurzonym materiałem, ułatwiając desorpcję z powierzchni włókien i w konsekwencji prowadząc do szybszego uwolnienia substancji z materiału (Rys. 3.8b).

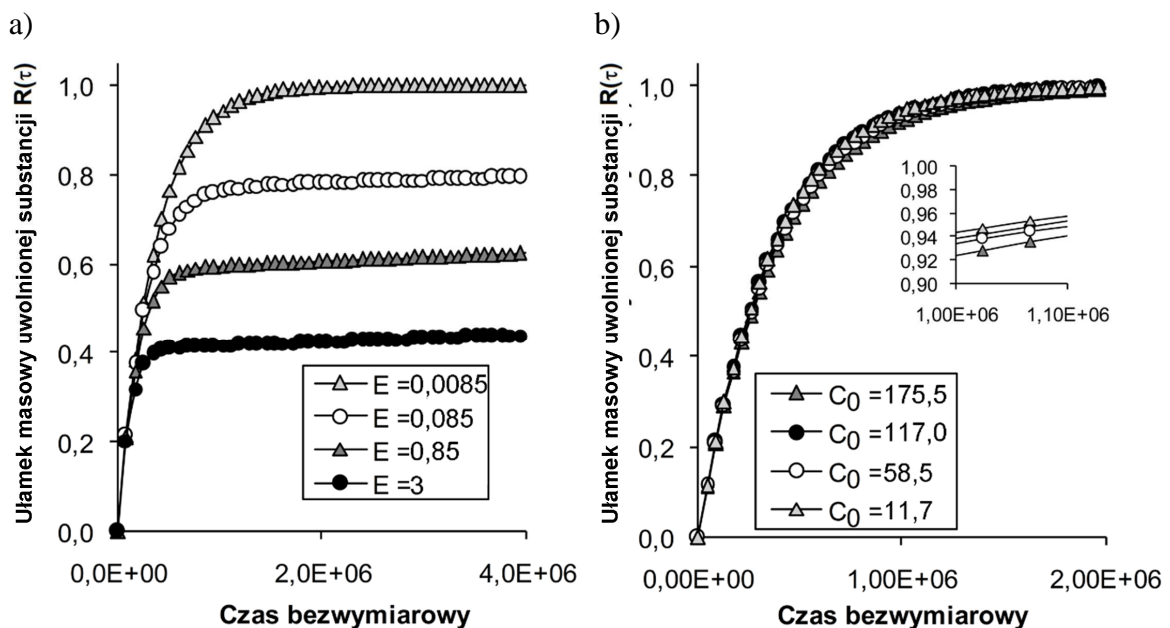


Rys. 3.8. a) Wpływ ilorazu współczynników dyfuzji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-4}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$ b) Wpływ równowagi sorpcji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-4}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$

Dla warunku w którym transport składnika przez powierzchnię włókno - płyn jest utrudniony ($Sh = 1 \cdot 10^{-7}$), porowatość wewnętrzna włókna może spowodować przesunięcie poziomu uwolnienia leku (Rys. 3.9a). Dla struktur o małej porowatości wewnętrznej

($\varepsilon_w = 0,1$; $E = 3$) uwalnianie znacząco zmniejszyło szybkość przy poziomie 40% początkowej masy substancji.

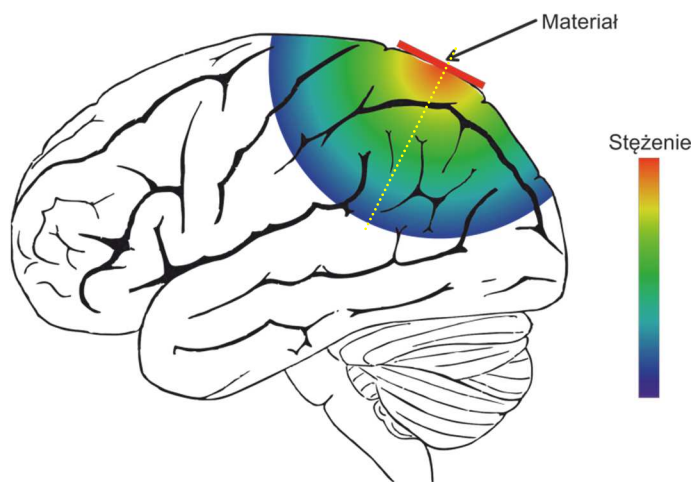
Model zakładający występowanie oporów transportu we włóknach, pomaga dokładniej opisać rzeczywiste procesy zachodzące na granicy włókno - płyn. Jednakże koszty obliczeniowe przedstawionego modelu są znacznie większe niż modelu uproszczonego, co stanowiło główne kryterium wyboru modelu uproszczonego w dalszych badaniach nad mechanizmami uwalniania z nanowłókien. W porównaniu do modelu uproszczonego, przedstawiony model charakteryzuje się również niską wrażliwością charakterystyki uwalniania w zależności od stężenia początkowego substancji (Rys. 3.9b). Z danych eksperymentalnych wynika (rozdział 4.1), iż zmiana początkowego stężenia substancji w nanowłóknach ma wpływ na profil uwalniania substancji, co wskazuje na pewne braki tego elementu modelu dla podanych parametrów procesu uwalniania. Dokładniejsza analiza przyczyn tej rozbieżności wykracza poza zakres obecnej pracy.



Rys. 3.9. a) Wpływ porowatości na szybkość uwalniania składnika z materiału przy zwiększonych oporach przenikania składnika z włókna do otaczającego płynu. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$ b) Wpływ stężenia początkowego na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-4}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-3}$, $D = 5 \cdot 10^{-4}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$.

3.3.4. Makroskopowy, dwuwymiarowy model uwalniania leku z nanomateriału do hydrożelu

Celem tej części pracy było stworzenie dwuwymiarowego modelu opisującego uwalnianie leków z makroskopowego materiału zawierającego nanowłókna jak również dyfuzję składnika w hydrożelu odtwarzającym warunki środowiska panujące w tkance mózgowej.



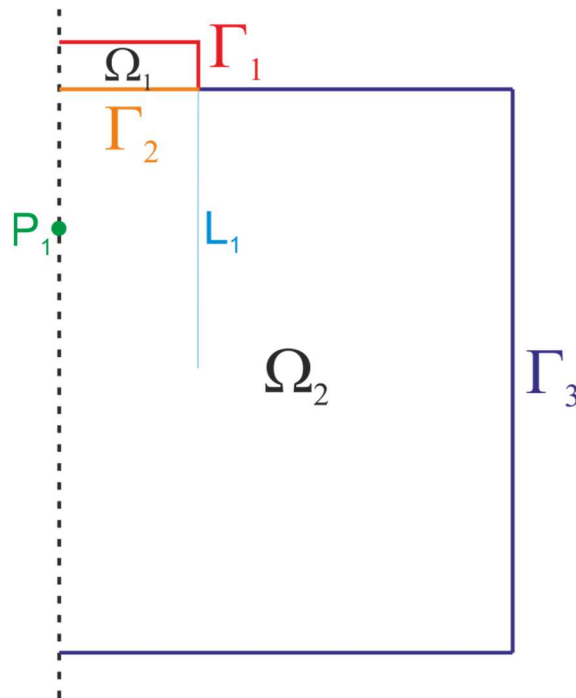
Rys. 3.10. Schemat przedstawiający miejsce zastosowania opatrunku i efekt jego działania w postaci wzrostu stężenia leku w mózgu. Przerywana żółta linia to oś symetrii w uproszczonym układzie biorącym pod uwagę dyfuzję leku we fragmencie tkanki mózgowej (Rys. 3.11).

W poniżej przedstawionym modelu wprowadzono wiele uproszczeń (w porównaniu do modelu mikroskopowego). Przede wszystkim zastosowano podejście w którym nie uwzględniono bezpośrednio geometrii włókien (grubości i ukierunkowania), a jedynie pośrednio poprzez zmianę efektywnego współczynnika dyfuzji, oszacowanego na podstawie obliczeń mikroskopowych modelu.

3.3.4.1. Założenia podstawowego modelu makroskopowego

W przedstawionym modelu procesu uwalniania składnika rozważa się nieustalony proces desorpcji z włókna i dyfuzji w materiale polimerowym. W modelu zakładamy homogeniczny rozkład substancji w matrycy polimerowej. Wymiary modelowanego materiału wynoszą: promień $r = 2,5 \cdot 10^{-3}$ m oraz grubość $d = 100 \cdot 10^{-6}$ m. W momencie kontaktu materiału z żelem rozpoczyna się desorpcja składnika z nanowłókien. Zakładamy, że czas wypełnienia porów żelem można zaniedbać. Dodatkowo nie rozpatrujemy procesu degradacji, gdyż czas rozpadu w przypadku użytych polimerów wynosi od roku do dwóch lat, zaś analizowany czas uwalniania leków wynosi około trzech tygodni. Dyfuzję składnika

w domenie Ω_1 oraz Ω_2 opisano równaniem Ficka. Wymiar domeny Ω_2 : wysokość $3 \cdot 10^{-2}$ m, szerokość $3 \cdot 10^{-2}$ m.



Rys. 3.11. Dwuwymiarowa domena obliczeniowa przedstawiająca modelowany materiał (Ω_1) oraz subdomena hydrożelu imitującego tkankę nerwową (Ω_2). Wymiary modelowanego materiału wynoszą: promień $r = 2,5 \cdot 10^{-3}$ m oraz grubość $d = 100 \cdot 10^{-6}$ m. Wymiar domeny Ω_2 : wysokość $3 \cdot 10^{-2}$ m, szerokość $3 \cdot 10^{-2}$ m.

Zmiana stężenia składnika zaadsorbowanego na powierzchni nanowłókien (domena Ω_1) wyrażona jest przez izotermę Langmuira z członami adsorpcji – desorpcji:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = k_a(C_A^{\max} - C_A)C_B - k_d C_A \quad (3.62)$$

gdzie: C_A – stężenie składnika zaadsorbowanego na powierzchni nanowłókien, w przeliczeniu na masę polimerowego opatrunku (kg składnika/kg polimeru), C_A^{\max} – stężenie maksymalne składnika na powierzchni materiału polimerowego (kg/kg), C_B – stężenie składnika w płynie wypełniającym materiał (domenę Ω_1) (kg/m^3), k_a , k_d – stałe szybkości odpowiednio adsorpcji ($\text{m}^3/\text{kg} \cdot \text{s}$) i desorpcji (1/s).

Czasoprzestrzenną zmianę stężenia składnika w domenie Ω_1 , w której następuje proces adsorpcji – desorpcji substancji na powierzchni materiału oraz dyfuzji niezwiązanej postaci składnika w domenie Ω_1 , opisano poniższym równaniem:

$$\varepsilon \frac{\partial C_B}{\partial t} = \varepsilon D_B \left(\frac{\partial^2 C_B}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_B}{\partial y^2} \right) - \rho_p (1 - \varepsilon) [k_a (C_A^{\max} - C_A) C_B - k_d C_A] \quad (3.63)$$

gdzie: ε – porowatość materiału (-), D_B – współczynnik dyfuzji efektywnej substancji w domenie Ω_2 (m^2/s), ρ_p – gęstość polimeru (kg/m^3).

Dyfuzja niezwiązanej postaci substancji w domenie Ω_2 (tkanka lub jej fantom) wyrażona jest równaniem Ficka:

$$\frac{\partial C_{Bf}}{\partial t} = D_{Bf} \left(\frac{\partial^2 C_{Bf}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{Bf}}{\partial y^2} \right) \quad (3.64)$$

gdzie: C_{Bf} - stężenie substancji w domenie Ω_2 (kg/m^3), D_{Bf} - współczynnik dyfuzji w domenie Ω_2 (m^2/s).

3.3.4.2. Warunki brzegowe i początkowe

Na powierzchni kontaktu domen Ω_2 i $\Omega_2 - \Gamma_2$ zastosowano warunek brzegowy transportu składnika przez barierę materiał - tkanka:

$$N_B = N_{Bf} = -k_c (C_B^{\text{pow}} - C_B) = k_c (C_{Bf} - C_{Bf}^{\text{pow}}) \quad (3.65)$$

gdzie: k_c - współczynnik transportu masy przez granicę materiał - tkanka (m/s), C_B^{pow} , C_{Bf}^{pow} - stężenia składnika na powierzchni granicznej (kg/m^3).

Na ściankach domeny - Γ_3 ustanowiono warunek brzegowy kontaktu z płynem o nieskończonej objętości:

$$N_S = k_c^{\text{out}} (C_{Bf} - C_{Bf}^{\text{out}}) \quad (3.66)$$

gdzie: k_c^{out} – współczynnik transportu masy (m/s), C_{Bf}^{out} – stężenie w płynie otaczającym materiał wynoszące $C_{Bf}^{\text{out}} = 0 \text{ kg/m}^3$.

Stężenia początkowe niezwiązanej postaci składnika w materiale oraz tkance wynoszą $C_{B0} = C_{Bf0} = 1 \text{ kg/m}^3$, zaś stężenie zaadsorbowanej postaci składnika na powierzchni włókien w materiale $C_{A0} = 0,01 \text{ kg składnika/kg polimeru}$.

Masę składnika obecnego w materiale w czasie t obliczono z równania:

$$M_t = \int_{\Omega_1} \rho_p C_A d\Omega_1 + \int_{\Omega_1} C_B d\Omega_1 \quad (3.67)$$

gdzie: ρ_p – gęstość właściwa polimeru (kg/m^3), Ω_1 – domena materiału z włóknami.

3.3.4.3. Model bezwymiarowy

Podobnie jak w poprzednich przypadkach, stężenia składnika w postaci zaadsorbowanej i niezwiązanej odniesiono do stężeń początkowych, zaś współrzędne w kartezjańskim układzie współrzędnych, odniesiono do grubości materiału L . Jako skalę czasową procesu ponownie wybrano czas dyfuzji składnika w materiale z nanowłóknien (3.32).

Po podstawieniu do równań (3.62) - (3.64) otrzymujemy:

$$\frac{dA}{d\tau} = \frac{k_d L^2}{D_B} \left[\frac{k_a}{k_d} C_{B0} (A^{\max} - A) B - A \right] \quad (3.68)$$

$$\frac{dB}{d\tau} = \frac{\partial^2 B}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Y^2} - \rho_p \frac{C_{A0} (1 - \varepsilon) k_d L^2}{C_{B0} \varepsilon D_B} \left[\frac{k_a}{k_d} C_{B0} (A^{\max} - A) B - A \right] \quad (3.69)$$

$$\frac{\partial B_f}{\partial \tau} = \frac{D_{Bf}}{D_B} \left(\frac{\partial^2 B}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Y^2} \right) \quad (3.70)$$

Warunek brzegowy strumienia składnika przez powierzchnię graniczną domen Ω_1 i Ω_2 :

$$N_B = N_{Bf} = \frac{k_c L}{D_B} C_{B0} (B - B^{\text{pow}}) = \frac{k_c L}{D_B} C_{Bf0} (B_f^{\text{pow}} - B_f) \quad (3.71)$$

Warunek brzegowy kontaktu z płynem otaczającym domenę Ω_2 :

$$N_S = \frac{k_c^{\text{out}L}}{D_{Bf}} (B_f - B_f^{\text{out}}) \quad (3.72)$$

Podobnie jak w poprzednich modelach matematycznych, w powyższych równaniach wyróżniono liczbę kryterialną Damköhlera, wyrażającą stosunek czasu dyfuzji do czasu desorpcji, liczbę Sherwooda dla przenikania składnika z materiału do tkanki - Sh_1 oraz z tkanki do nieskończonej objętości - Sh_2 . Dodatkowo, wyróżniono stałą równowagi procesu adsorpcji-desorpcji - K , bezwymiarowy współczynnik dyfuzji składnika - D , parametr związany z porowatością materiału - $E = (1 - \varepsilon)/\varepsilon$; stosunek początkowych stężeń i gęstości nośnika polimerowego - C_0 (3.42).

Po podstawieniu do równań (3.68) - (3.70) otrzymujemy uproszczony układ równań:

$$\frac{dA}{d\tau} = Da [K (A^{\max} - A) B - A] \quad (3.73)$$

$$\frac{dB}{d\tau} = \frac{\partial^2 B}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Y^2} - C_0 E Da [K (A^{\max} - A) B - A] \quad (3.74)$$

$$\frac{\partial B_f}{\partial \tau} = D \left(\frac{\partial^2 B}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Y^2} \right) \quad (3.75)$$

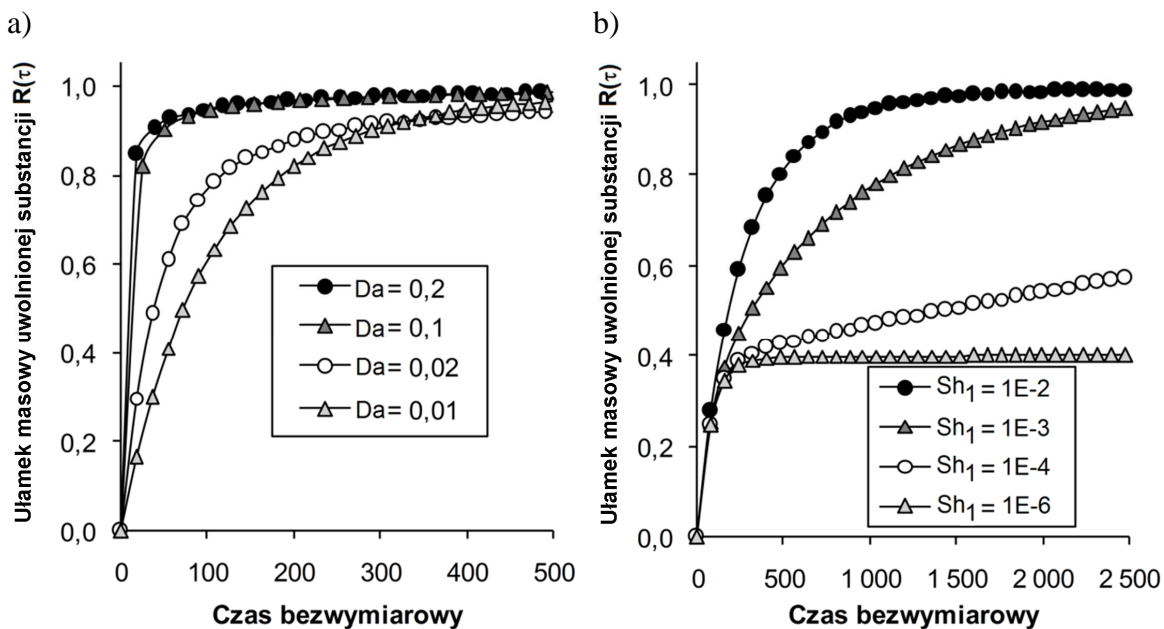
3.3.4.4. Rozwiązanie modelu matematycznego

Obliczenia wpływu poszczególnych parametrów na szybkość uwalniania składnika z materiału wykonano dla parametrów przedstawionych w tabeli 3.3.

Tab. 3.3. Zakresy parametrów zastosowane w obliczeniach.

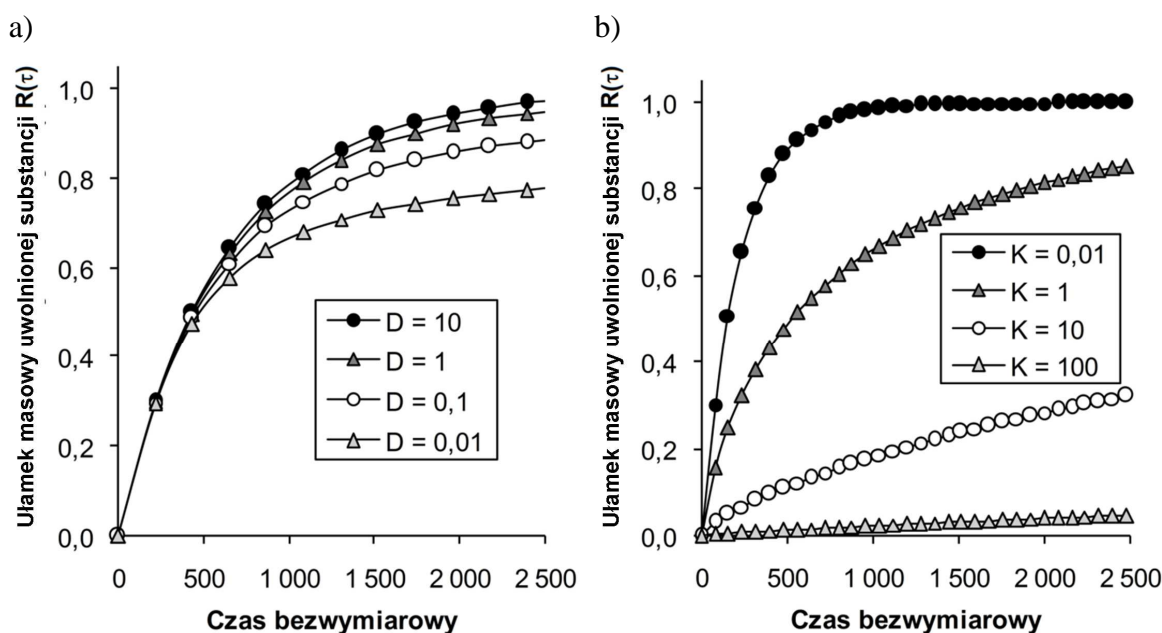
Da	Sh ₁	Sh ₂	D
1·10 ⁻² - 2·10 ⁻¹	1·10 ⁻⁶ - 1·10 ⁻²	1·10 ⁻⁷ - 1·10 ⁻⁸	1·10 ⁻² - 1·10 ²
K	E	C ₀	
1·10 ⁻² - 1·10 ⁴	8,5·10 ⁻³ - 3	1,17·10 ¹ - 1,75·10 ²	

W przedstawionej homogenicznej makrostrukturze niewielki wzrost stałej desorpcji (por. Da = 0,01 i Da = 0,02) prowadzi do znacznego przyspieszenia uwalniania substancji z materiału (Rys. 3.12a). Akumulacja niezwiązanej postaci składnika w materiale spowodowana zwiększeniem oporów przenikania przez granicę materiał - tkanka (domeny Ω₁ i Ω₂) (Sh₁ = 1·10⁻⁶) zahamowała proces desorpcji z włókien (Rys. 3.12b).



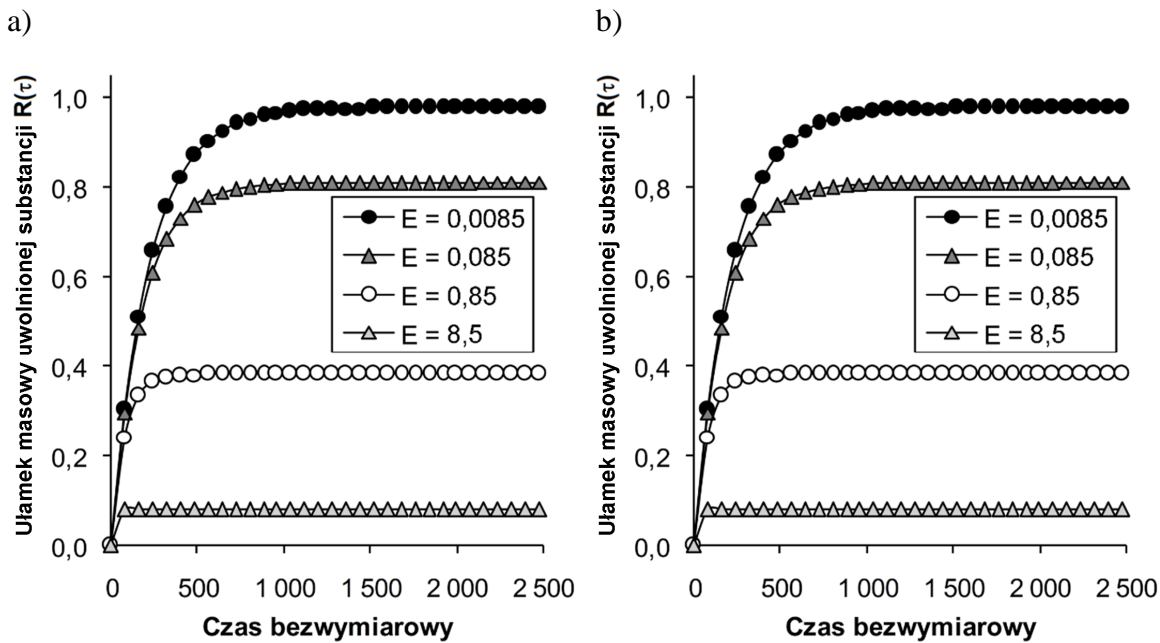
Rys. 3.12. a) Wpływ liczby Damköhlera na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: Sh₁ = 1·10⁻², Sh₂ = 1·10⁻², D = 10, K = 1·10⁻¹, E = 1,7·10⁻², C₀ = 1,17·10¹ b) Wpływ oporu przenikania składnika z materiału do hydrożelu na szybkość uwalniania składnika. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: Da = 1·10⁻², Sh₂ = 1·10⁻², D = 10, K = 1·10⁻¹, E = 1,7·10⁻², C₀ = 1,17·10¹

Zwiększenie wartości współczynnika dyfuzji składnika w porach materiału, w przypadku materiału makroskopowego jedynie nieznacznie przyspieszyło uwolnienie substancji z materiału (por. $D = 1$ i $D = 10$; Rys. 3.13a). Ułatwienie desorpcji lub zahamowanie adsorpcji na powierzchni włókien przez zmianę nośnika leku lub samego leku, może prowadzić do szybszego uwolnienia substancji z materiału.



Rys. 3.13. a) Wpływ ilorazu współczynników dyfuzji na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$ b) Wpływ równowagi sorpcji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{27}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D = 10$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$.

Dla warunku w którym transport składnika przez powierzchnię materiał - tkanka jest utrudniony ($Sh_1 = 1 \cdot 10^{-6}$), porowatość materiału powoduje przesunięcie poziomu uwolnienia leku (Rys. 3.14a). Można to uzasadnić w ten sposób, że im większy jest udział fazy stałej z lekiem w materiale, tym uwalnianie substancji z jej wnętrza jest bardziej utrudnione. Zmniejszona jest objętość porów w materiale dla dyfuzji substancji oraz większość substancji pozostanie w polimerowych włóknach. Wpływ stężenia początkowego na charakterystykę uwalniania przedstawiono na rysunku (3.14b). Zauważalny jest wzrost szybkości uwalniania w początkowej fazie, który dla ilości leku w materiale przekraczającej 15% może doprowadzić do niekorzystnego zjawiska wyrzutu dużej dawki leku.



Rys. 3.14. a) Wpływ porowatości na szybkość uwalniania składnika z materiału przy zwiększonych oporach przenikania składnika z włókna do otaczającego płynu. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-6}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$ b) Wpływ stężenia początkowego na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da = 5 \cdot 10^{-7}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D = 10$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$.

3.3.5. Rozszerzony, dwuwymiarowy model uwalniania leków z materiału do hydrożelu i płynu

Z uwagi na umiejscowienie opatrunku neuroprotekcynowego w mózgu, do poprzednio zaprezentowanego modelu makroskopowego (podrozdział 3.3.4.) wprowadzono dodatkową domenę odzwierciedlającą przestrzeń podpajęczynówkową. Domena Ω_3 znajdująca się nad odpowiednikiem tkanki mózgowej Ω_2 i materiałem Ω_1 została wprowadzona celem zamodelowania konwekcyjnego transportu substancji z materiału przez płyn omywający materiał. Przestrzeń podpajęczynówkowa ma skomplikowaną budowę i zawiera wiele beleczkowatych struktur umieszczonych w poprzek do kierunku przepływającego płynu, spajających błonę miękka i pajęczą. Ich złożona budowa, niejednorodna grubość (rzędu kilkudziesięciu mikrometrów) i przypadkowe ułożenie w przestrzeni jest często niemożliwe do bezpośredniego wprowadzenia do modelu [142], [143]. Wpływ struktury i występowania beleczek na rozkład prędkości w przestrzeni podpajęczynówkowej jest istotny, dlatego wielu badaczy przyjmuje w swoich obliczeniach porowatą strukturę przestrzeni podpajęczynówkowej z anizotropią przepuszczalności [142], [143]:

$$\frac{k_l}{r^2} = \frac{\varepsilon^2(\pi + 2,157(1 - \varepsilon))}{48(1 - \varepsilon)^2} \quad (3.76)$$

$$\frac{k_t}{r^2} = \frac{\pi\varepsilon(1 - \sqrt{1 - \varepsilon})^2}{24(1 - \varepsilon)^{3/2}} \quad (3.77)$$

gdzie: k_l - przepuszczalność wzdłużna (równoległa do beleczek) (m^2), k_t - przepuszczalność poprzeczna (m^2), ε - porowatość przestrzeni podpajęczynówkowej rzędu 0,98 – 0,99 (-).

Równanie ruchu płynu w dwuwymiarowej przestrzeni podpajęczynówkowej wykorzystujące powyższe zależności można zapisać równaniem:

$$\rho \left(\frac{\partial u}{\partial t} + \vec{u} \cdot \nabla \vec{u} \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{u} - \mu \left(\frac{u_1}{k_l} / \frac{u_2}{k_t} \right) \quad (3.78)$$

gdzie: ρ - gęstość płynu mózgowo – rdzeniowego (kg/m^3), \vec{u} - wektor prędkości płynu (m/s), ∇p - spadek ciśnienia (Pa), μ - lepkość płynu mózgowo – rdzeniowego (Pa·s).

W niniejszej pracy zdecydowano wykorzystać wyłącznie paraboliczny rozkład prędkości, wprowadzony bezpośrednio do równania transportu składnika. Dzięki temu zabiegowi zmniejszono znacząco czas obliczeń, jednocześnie zachowując zbliżony w obu przypadkach charakter przepływu. Dodatkowo, w domenie Ω_2 wprowadzono człon reakcyjny odpowiadający za eliminację substancji z domeny. Współczynnik reakcji eliminacji, która jest wypadkową wielu mechanizmów usuwania leków w tkance została dobrana dla danej substancji na podstawie danych literaturowych [116].

Tak duże uproszczenia polegające na redukcji modelu do postaci dwuwymiarowej i wprowadzenie przepływu płynu bez rozwiązywania równań Naviera - Stokesa nie oddają w istocie pełni zjawisk zachodzących w przestrzeni podpajęczynówkowej. Jednak wprowadzenie do modelu numerycznego konwekcyjnego transportu składnika daje możliwość oszacowania wpływu prędkości przepływu i częstości pulsacji płynu mózgowo - rdzeniowego na szybkość odbierania składnika z powierzchni porowatego materiału a tym samym oszacowanie profilu uwalniania leku z nanowłókien. Dzięki takiemu podejściu zredukowany zostaje również poziom złożoności problemu, a także czas potrzebny na rozwiązanie wieloparametrycznego modelu matematycznego.

3.3.5.1. Założenia rozszerzonego modelu makroskopowego

Zmianę stężenia składnika zaadsorbowanego na powierzchni nanowłókien (domena Ω_1) ponownie opisano izotermą Langmuira z członami adsorpcji – desorpcji:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = k_a(C_A^{\max} - C_A)C_B - k_d C_A \quad (3.79)$$

gdzie: C_A – stężenie składnika zaadsorbowanego na powierzchni nanowłókien, w przeliczeniu na masę polimerowego opatrunku (kg składnika/kg polimeru), C_A^{\max} – stężenie maksymalne składnika na powierzchni materiału (kg/kg), C_B – stężenie składnika w płynie (kg/m³), k_a , k_d – stałe szybkości odpowiednio adsorpcji (m³/kg·s) i desorpcji (1/s).

Czasoprzestrzenną zmianę stężenia w materiale w którym następuje proces adsorpcji-desorpcji substancji na powierzchni włókna oraz dyfuzji niezwiązanej postaci substancji w płynie wypełniającym przestrzeń między włóknami, opisano poniższym równaniem:

$$\varepsilon \frac{\partial C_B}{\partial t} = \varepsilon D_B \left(\frac{\partial^2 C_B}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_B}{\partial y^2} \right) - \rho_p(1 - \varepsilon)[k_a(C_A^{\max} - C_A)C_B - k_d C_A] \quad (3.80)$$

gdzie: ε – porowatość materiału (-), D_B – współczynnik dyfuzji efektywnej składnika w płynie otaczającym nanowłókna (m²/s), ρ_p – gęstość polimeru (kg/m³).

Dyfuzja w domenie Ω_2 wyrażona jest równaniem Ficka z członem reakcji eliminacji substancji z domeny:

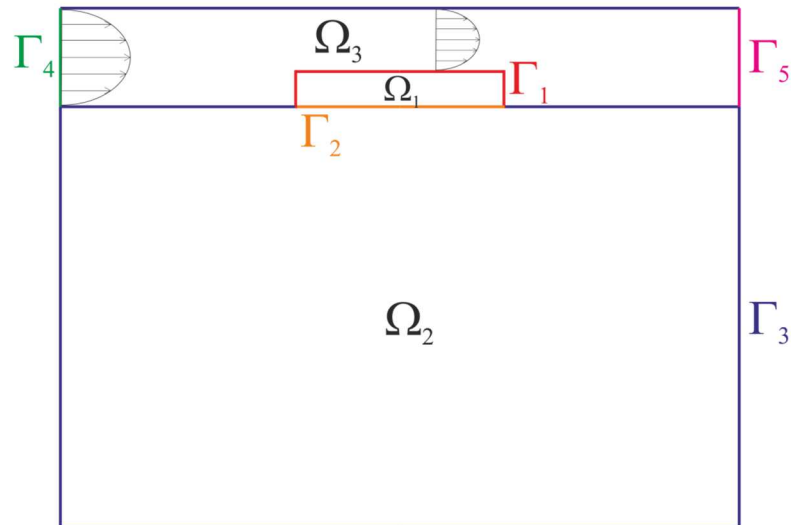
$$\frac{\partial C_{Bf}}{\partial t} = D_{Bf} \left(\frac{\partial^2 C_{Bf}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{Bf}}{\partial y^2} \right) - k_e C_{Bf} \quad (3.81)$$

gdzie: C_{Bf} - stężenie w składnika w domenie Ω_2 (kg/m³), D_{Bf} - współczynnik dyfuzji w domenie Ω_2 (tkanka) (m²/s), k_e - współczynnik reakcji eliminacji składnika (1/s).

Dyfuzja w płynie (domena Ω_3) wyrażona jest równaniem Ficka z członem konwekcyjnym:

$$\frac{\partial C_{Bs}}{\partial t} + \nabla \cdot (C_{Bs} \vec{u} - D_{Bs} \nabla C_{Bs}) = 0 \quad (3.82)$$

gdzie: C_{Bs} - stężenie składnika w płynie omywającym materiał (domena Ω_3) (kg/m³), D_{Bs} - współczynnik dyfuzji w domenie Ω_3 (m²/s), \vec{u} – wektor prędkości płynu (m/s).



Rys. 3.15. Dwuwymiarowa domena obliczeniowa przedstawiająca modelowany materiał (Ω_1), subdomenę hydrożelu imitującego tkankę nerwową (Ω_2) oraz subdomenę reprezentującą przestrzeń podpajęczynówkową, którą płynie płyn mózgowo – rdzeniowy (Ω_3). Wymiary modelowanego materiału wynoszą $r = 2,5 \cdot 10^{-3}$ m oraz grubość $d = 100 \cdot 10^{-6}$ m. Wymiar domeny Ω_2 : wysokość $3 \cdot 10^{-2}$ m, szerokość $3 \cdot 10^{-2}$ m.

3.3.5.2. Warunki brzegowe i początkowe

Na powierzchni kontaktu materiału z płynem Γ_1 odpowiednio w domenach materiału i płynu, zastosowano następujące warunki brzegowe:

$$N_B = N_{Bs} = k_{c2}(C_B - C_B^{\text{pow}}) = k_{c2}(C_{Bs}^{\text{pow}} - C_{Bs}) \quad (3.83)$$

gdzie: k_{c2} - współczynnik transportu masy przez granicę materiał - płyn (m/s), C_B^{pow} , C_{Bs}^{pow} - stężenia obu składników na powierzchni granicznej (kg/m^3).

Na powierzchni kontaktu materiału z tkanki Γ_2 odpowiednio w domenach materiału i płynu zastosowano następujące warunki brzegowe:

$$N_B = N_{Bf} = k_c(C_B - C_B^{\text{pow}}) = k_c(C_{Bf}^{\text{pow}} - C_{Bf}) \quad (3.84)$$

gdzie: k_c - współczynnik transportu masy przez granicę materiał - tkanka (m/s), C_B^{pow} , C_{Bf}^{pow} - stężenia obu składników na powierzchni granicznej (kg/m^3).

Na ściankach domeny Ω_2 (tkanki) - Γ_3 ustalono warunek brzegowy kontaktu z płynem o nieskończonej objętości, stąd też:

$$N_o = k_c^{\text{out}}(C_{Bf} - C_{Bf}^{\text{out}}) \quad (3.85)$$

gdzie: k_c^{out} - współczynnik transportu masy (m/s), C_{Bf}^{out} - stężenie w płynie otaczającym materiał wynoszące $C_{Bf}^{\text{out}} = 0 \text{ kg}/\text{m}^3$.

Na ścianie wlotowej (Γ_4) do domeny Ω_3 zaproponowano warunek brzegowy prędkości z parabolicznym profilem zależnym od współrzędnej y :

$$u(y) = u_{\max} \left[1 - \left(\frac{y - 0,5\delta}{0,5\delta} \right)^2 \right] \quad (3.86)$$

gdzie: δ - wysokość przestrzeni podpajęczynówkowej (jest to wielkość zmienna, zależna od położenia, na potrzeby symulacji ustalono jej wartość w zakresie $\delta = 1,5 - 4$ mm), y – położenie (m), u_{\max} jest prędkością maksymalną płynu mózgowo-rdzeniowego zawierającą się pomiędzy 0,00005 – 0,5 mm/s. Doświadczalnie wyznaczona prędkość maksymalna w czaszkowej części przestrzeni podpajęczynówkowej nie jest znana, przez co przyjęto tak dużą rozpiętość prędkości płynu. W poniższych obliczeniach posłużono się wartościami maksymalnej prędkości płynu mózgowo-rdzeniowego z obliczeń numerycznych i badań obrazowania metodą rezonansu magnetycznego przeprowadzonych przez Guptę i in. [143], [144] oraz Linningera i in. [145].

W niniejszej pracy założono, że pulsacje przepływu płynu mózgowo - rdzeniowego są skorelowane z przepływem krwi (powstawanie i absorpcja płynu mózgowo-rdzeniowego) i częstością akcji serca. Zmianę prędkości przepływu płynu w funkcji położenia i czasu można zatem opisać równaniem [145]–[147]:

$$v(y, t) = u(y) |\sin(\pi f t)| \quad (3.87)$$

gdzie: $u(y)$ – prędkość obliczona z równania (3.86) (m/s), f – częstotliwość pulsacji przepływu płynu (1/s), t – czas (s).

Na wylocie płynu z domeny obliczeniowej - Γ_5 ustanowiono warunek konwekcyjnego wypływu. W warunkach rzeczywistych uwolniony składnik trafia przez granulacje pajęczynówki do krwioobiegu, dlatego istotne jest ustalenie ilości leku trafiającej do ustroju i oddziałującej na cały organizm.

Stężenia początkowe niezwiązanej postaci składnika w materiale, hydrożelu oraz płynie wynoszą: $C_{B0} = C_{Bf0} = C_{Bs0} = 1$ kg/m³, zaś stężenie zaadsorbowanej postaci składnika na powierzchni włókien w materiale $C_{A0} = 0,01$ kg składnika/kg materiału.

Masę składnika obecnego w materiale w czasie t obliczono z równania:

$$M_t = \int_{\Omega_1} \rho_p C_A d\Omega_1 + \int_{\Omega_1} C_B d\Omega_1 \quad (3.88)$$

gdzie: ρ_p – gęstość właściwa materiału polimerowego (kg/m^3), Ω_1 – domena materiału z włóknami.

Tab. 3.4. Parametry prędkości płynu mózgowo - rdzeniowego oraz wysokość przestrzeni podpajęczynówkowej.

Parametr	Symbol	Wartość
Maksymalna prędkość płynu mózgowo-rdzeniowego w przestrzeni podpajęczynówkowej	u_{\max} (m/s)	$0,5 \cdot 10^{-3} - 0,5 \cdot 10^{-8}$
Częstotliwość pulsacji płynu związana z częstością akcji serca (bpm - uderzenia na minutę)	f (1/s)	1,2 (72 bpm) 2,0 (120 bpm)
Wysokość przestrzeni podpajęczynówkowej	δ (m)	$1,5 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-3}$
Współczynnik eliminacji składnika w tkance mózgowej (NGF) [116]	k_e (1/s)	$2,5 \cdot 10^{-4}$

3.3.5.3. Model bezwymiarowy

Podobnie jak w poprzednich przypadkach, stężenia składnika w postaci zaadsorbowanej i niezwiązanej odniesiono do stężeń początkowych (3.32), zaś współrzędne w kartezjańskim układzie współrzędnych odniesiono do grubości materiału L (3.33). Czas dyfuzji składnika w materiale polimerowym odniesiono jako skalę czasu (3.34).

Lokalną prędkość płynu w domenie Ω_3 odniesiono do prędkości maksymalnej przepływu płynu mózgowo - rdzeniowego $u_0 = u_{\max}$:

$$v^* = \frac{v}{u_0} \quad (3.89)$$

Po podstawieniu do równań (3.79) - (3.82) otrzymujemy:

$$\frac{dA}{d\tau} = \frac{k_d L^2}{D_B} \left[\frac{k_a}{k_d} C_{B0} (A^{\max} - A) B - A \right] \quad (3.90)$$

$$\frac{dB}{d\tau} = \left(\frac{\partial^2 B}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Y^2} \right) - \rho_p \frac{C_{A0} (1 - \varepsilon) k_d L^2}{C_{B0} \varepsilon D_B} \left[\frac{k_a}{k_d} C_{B0} (A^{\max} - A) D - A \right] \quad (3.91)$$

$$\frac{\partial B_f}{\partial \tau} = \frac{D_{Bf}}{D_B} \left(\frac{\partial^2 B_f}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B_f}{\partial Y^2} \right) + \frac{k_e L^2}{D_B} B_f \quad (3.92)$$

$$\frac{\partial B_s}{\partial \tau} + \frac{v_0 L}{D_B} v^* \cdot \nabla B_s = \frac{D_{Bs}}{D_B} \left(\frac{\partial^2 B_a}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B_a}{\partial Y^2} \right) \quad (3.93)$$

Warunek brzegowy strumienia masy przez powierzchnię materiał-domena hydrożelowa (Γ_2) wyrażono równaniem:

$$N_B = N_{Bf} = \frac{k_c L}{D_B} C_{B0} (B - B^{pow}) = \frac{k_c L}{D_B} C_{Bf0} (B_f^{pow} - B_f) \quad (3.94)$$

Warunek brzegowy strumienia masy przez powierzchnię materiał-płyn (Γ_1) reprezentujący płyn mózgowo-rdzeniowy (domena Ω_3) wyrażono równaniem:

$$N_B = N_{Bs} = \frac{k_{c2} L}{D_B} C_{B0} (B - B^{pow}) = \frac{k_{c2} L}{D_B} C_{Bs0} (B_s^{pow} - B_s) \quad (3.95)$$

Warunek brzegowy kontaktu domeny Ω_2 z płynem o stężeniu równym zero (Γ_3):

$$N_s = \frac{k_c^{out} \cdot L}{D_{Bf}} \cdot C_{Bf0} \cdot (B_f - B_f^{out}) \quad (3.96)$$

Podobnie jak we wcześniejszych rozważaniach, w powyższych równaniach można wyróżnić dwie liczby kryterialne Damköhlera. Pierwsza z nich wyraża stosunek czasu dyfuzji składnika do czasu desorpcji. Druga zaś, wyraża stosunek czasu dyfuzji składnika do czasu reakcji eliminacji składnika w domenie Ω_2 . W przedstawionych równaniach wyróżniono również liczbę Sherwooda dla przenikania składnika z materiału do domeny Ω_2 (Sh_1), z materiału do domeny Ω_3 (Sh_2) oraz z domeny Ω_2 do objętości o zerowym stężeniu składnika - Sh_3 . Podobnie jak w poprzednich modelach numerycznych, wyróżniono stałą równowagi procesu adsorpcji-desorpcji – K , parametr związany z porowatością – E , stosunek początkowych stężeń i gęstości polimeru oraz stosunek współczynników dyfuzji w domenie Ω_2 oraz domenie Ω_3 względem współczynnika dyfuzji w materiale – D .

Stosunek konwekcyjnego do dyfuzyjnego transportu masy można wyrazić liczbą Pecleta:

$$Pe = \frac{v_0 L}{D_B} \quad (3.97)$$

Po podstawieniu do równań (3.90) - (3.93) otrzymujemy uproszczony układ równań:

$$\frac{dA}{d\tau} = Da_1 [K (A^{\max} - A)B - A] \quad (3.98)$$

$$\frac{dB}{d\tau} = \left(\frac{\partial^2 B}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B}{\partial Y^2} \right) - C_0 E Da_1 [K (A^{\max} - A)B - A] \quad (3.99)$$

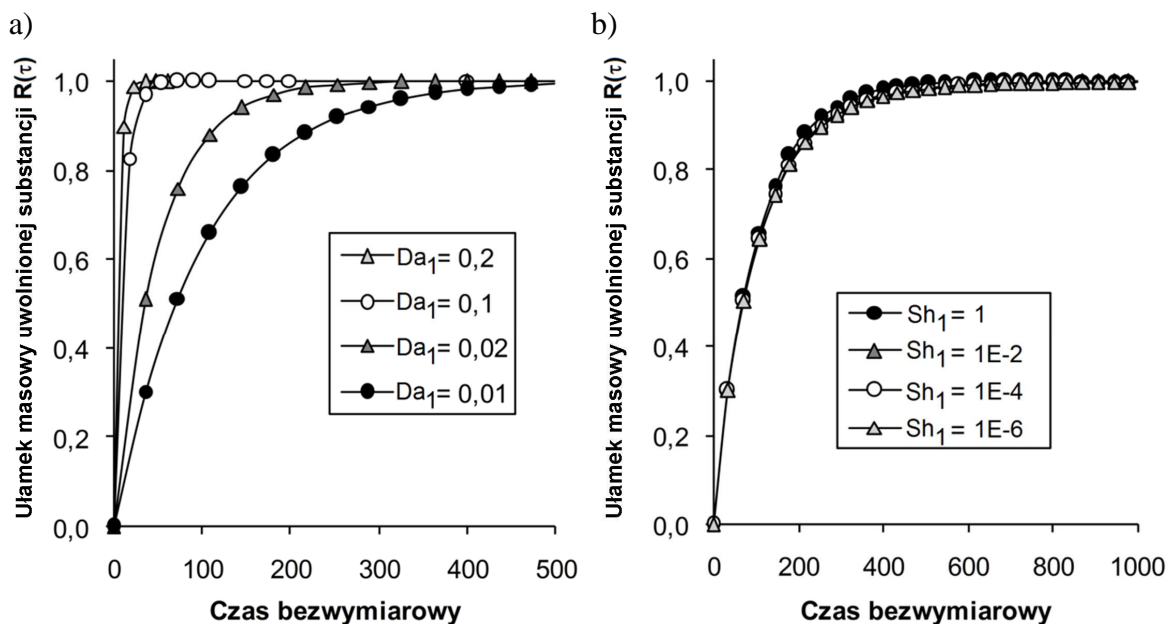
$$\frac{\partial B_f}{\partial \tau} = D_1 \left(\frac{\partial^2 B_f}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B_f}{\partial Y^2} \right) + Da_2 B_f \quad (3.100)$$

$$\frac{\partial B_s}{\partial \tau} + Pe v^* \cdot \nabla B_s = D_2 \left(\frac{\partial^2 B_a}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 B_a}{\partial Y^2} \right) \quad (3.101)$$

3.3.5.4. Rozwiązanie modelu numerycznego

Obliczenia wpływu poszczególnych parametrów na szybkość uwalniania składnika z materiału wykonano dla parametrów przedstawionych w tabeli 3.5. W tej części pracy tymczasowo przyjęto brak pulsacji prędkości płynu i przeanalizowano jedynie wpływ prędkości omywania materiału płynem na proces uwalniania składnika z nanowłóki.

W przedstawionej makrostrukturze z jednoczesnym transportem składnika do płynu (domena Ω_3 , płyn mózgowo - rdzeniowy) i hydrożelu (domena Ω_2 , tkanka) niewielki wzrost desorpcji leku z powierzchni włókien może doprowadzić do znacznego przyspieszenia uwalniania składnika z materiału. Zwiększenie oporów transportu masy po stronie tkanki nie spowodowało akumulacji niezwiązanej postaci składnika w materiale (Rys. 3.12b) z uwagi na przejście jego całości do płynu odprowadzanego z układu.

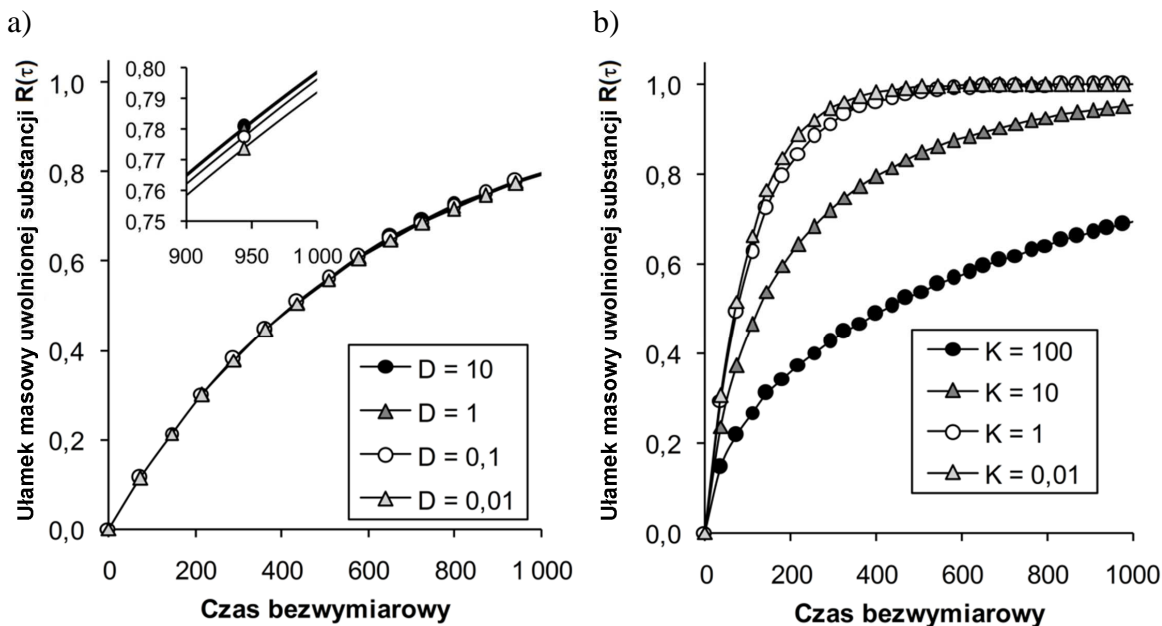


Rys. 3.16. a) Wpływ liczby Damköhlera (desorpcji) na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-1}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$. b) Wpływ oporu przenikania składnika z materiału do hydrożelu na szybkość uwalniania składnika. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-1}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$.

Tab. 3.5. Zakresy parametrów zastosowane w obliczeniach.

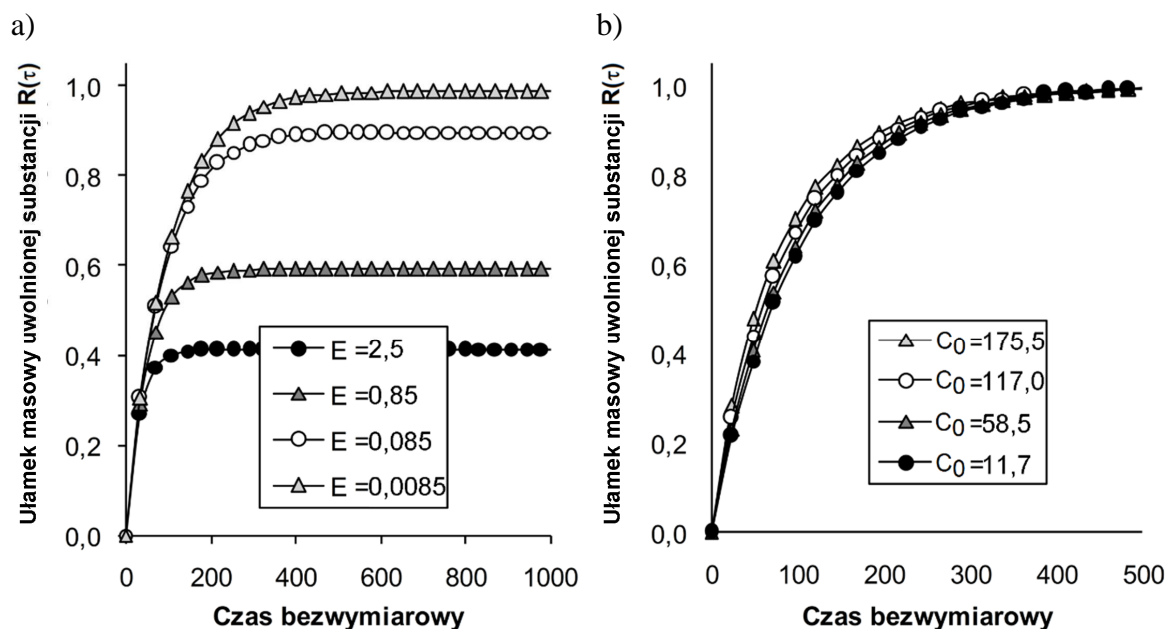
Da_1	Da_2	Sh_1	Sh_2, Sh_3	D_1
$1 \cdot 10^{-2} - 2 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-2} - 2 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^2$
D_2	K	E	C_0	Pe
$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^4$	$8.5 \cdot 10^{-3} - 2,5$	$1,17 \cdot 10^1 - 1,75 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^{-1} - 5 \cdot 10^3$

Warto zauważyć, że w badanym zakresie parametrów zwiększenie wartości współczynnika dyfuzji składnika w porach materiału oraz płynie omywającym materiał nie wpłynęło zauważalnie na uwalnianie składnika z materiału (Rys. 3.17a). Zwiększenie adsorpcji, czyli szybkości przyłączania cząsteczek z płynu do powierzchni włókien może spowolnić uwalnianie składnika z materiału, jednakże możliwości kontroli szybkości tego procesu są ograniczone i wiążą się z oddziaływaniem na inne procesy transportu składnika. Natomiast zmiana ilorazu współczynników kinetycznych wyraźnie pokazuje ich znaczący wpływ (Rys 3.17b).



Rys. 3.17. a) Wpływ równowagi sorpcji na szybkość uwalniania składnika z komórki elementarnej. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-7}$, $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-1}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-4}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$. b) Wpływ ilorazu współczynników dyfuzji na szybkość uwalniania składnika z materiału. W tym przypadku zaobserwowano podobny przebieg profili uwalniania składnika pod wpływem zmiany D_1 i D_2 . Z tego powodu przedstawiono wyłącznie jeden wykres uwalniania. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_2 = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$.

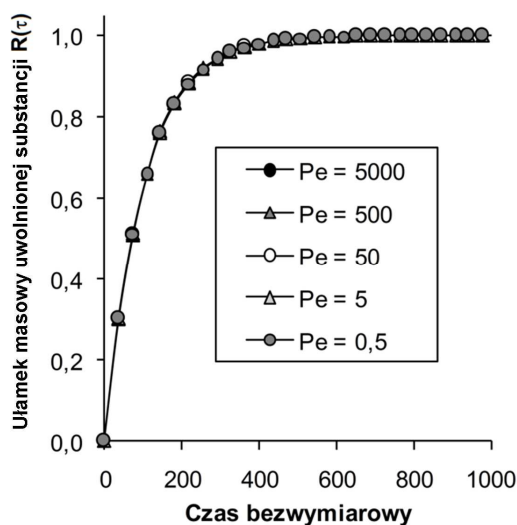
Dla warunku w którym transport składnika przez powierzchnię kontaktu materiał - płyn oraz materiał - tkanka jest utrudniony ($Sh_1, Sh_2 = 1 \cdot 10^{-7}$), wpływ porowatości materiału może spowodować przesunięcie poziomu uwolnienia leku (Rys. 3.18a). Dla struktur o niskiej porowatości ($\varepsilon = 0,25$; $E = (1 - \varepsilon)/\varepsilon = 3$) uwalnianie zahamowało na poziomie 41% początkowej masy składnika zaś dwukrotne zwiększenie porowatości ($\varepsilon = 0,5$; $E = 1$) zwiększyło ten poziom 1,4-krotnie do wysokości 59%. Przy braku oporów transportu do sąsiadujących domen, wpływ stężenia początkowego na profil uwalniania składnika jest mało zauważalny (Rys. 3.18b). Jednakże w porównaniu do modelu uproszczonego (por. Rys. 3.14b i Rys. 3.18b) w modelu rozszerzonym o transport do domeny płynu, szybkość uwalniania jest większa i pełne uwolnienie składnika zachodzi w krótszym czasie.



Rys. 3.18. a) Wpływ porowatości na szybkość uwalniania składnika z materiału przy zwiększonych oporach przenikania składnika z włókna do otaczającego płynu. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-2}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-7}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$, $Pe = 5 \cdot 10^3$ b) Wpływ stężenia początkowego na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Da_2 = 2,5 \cdot 10^{-1}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $K = 1$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $Pe = 5 \cdot 10^3$.

W przeprowadzonych obliczeniach testowano również wpływ maksymalnej prędkości, wyrażonej w postaci bezwymiarowej jako liczba Pecleta, przepływającego płynu w domenie Ω_3 . Z uwagi na brak danych literaturowych i wyników własnych dotyczących prędkości w czaszkowej części przestrzeni podpajęczynówkowej, przeprowadzono testowe obliczenia zakładając wartość tej prędkości przepływu płynu w granicach 0,00005 – 0,5

mm/s ($Pe = 0,5 - 5000$). Okazuje się, że zaobserwowany wpływ prędkości na szybkość uwalniania jest minimalny. Jednakże, analiza zmian ilości składnika wnikażącej do płynu i przenoszonej wraz z płynem mózgowo-rdzeniowym do krwi a następnie ustroju może być istotna dla oszacowania prawdopodobnych skutków ubocznych działania leku na cały organizm. Rozważania nad wpływem pulsacji, prędkości maksymalnej oraz wysokości przestrzeni podpajęczynówkowej na szybkość transportu składnika z materiału do płynu przedstawiono w rozdziale czwartym.



Rys. 3.19. Wpływ liczby Pecleta na szybkość uwalniania składnika z materiału. Wartości pozostałych parametrów nie objętych zmianą: $Da_1 = 2 \cdot 10^{-2}$, $Sh_1 = 1 \cdot 10^{-6}$, $D_1 = 10$, $D_2 = 10$, $Sh_2 = 1 \cdot 10^{-2}$, $Sh_3 = 1 \cdot 10^{-2}$, $K = 1 \cdot 10^{-1}$, $E = 1,7 \cdot 10^{-2}$, $C_0 = 1,17 \cdot 10^1$.

3.4. Podsumowanie

Pierwszy z zaprezentowanych modeli numerycznych uwzględnia mikrostrukturę materiału z nanowłóknami. Dzięki podejściu uwzględniającemu uwalnianie substancji wyłącznie z zewnętrznej powierzchni nanowłóknami możliwa jest szybka analiza wpływu ułożenia włókien w modelowanym elemencie materiału na szybkość uwalniania składnika. Analiza uwalniania składnika w modelu rozszerzonym, gdzie uwzględniono nanoporowatość włókien jest znacznie kosztowniejsza pod względem zwiększonego czasu symulacji w porównaniu do modelu podstawowego. Jest to związane ze znacznym zwiększeniem ilości elementów (komórek obliczeniowych) we włóknach. W obu przypadkach, złożoność przygotowania geometrii obliczeniowej jest zbliżona i zależy od złożoności mikrostruktury. Z przeprowadzonych symulacji numerycznych modelu rozszerzonego można zauważyć iż wpływ stężenia początkowego składnika we włóknie na przebieg profilu uwalniania jest niewielki, czego nie potwierdzają wykonane badania eksperymentalne (Rys. 4.20).

Wyniki badań i dyskusja

4.1. Uwalnianie leków do roztworów wodnych

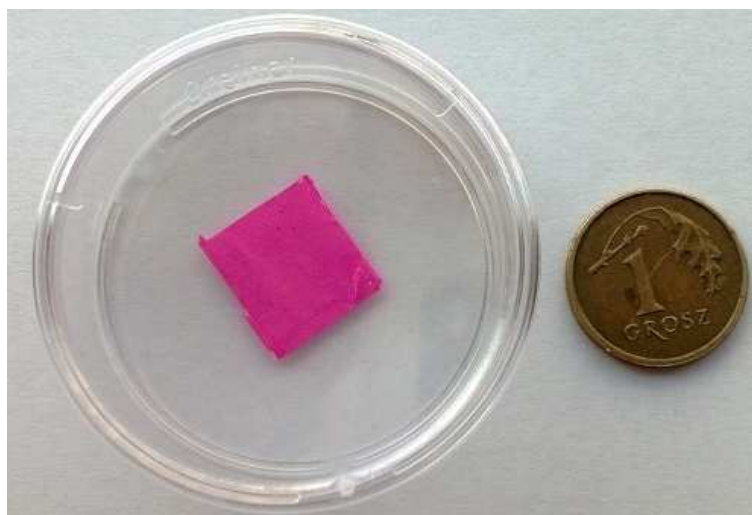
Standardowa ocena szybkości uwalniania leków wykonywana jest poprzez zanurzenie badanego materiału w płynie o własnościach zbliżonych do płynu fizjologicznego. Aby odzwierciedlić warunki panujące w ludzkim organizmie, uwalnianie prowadzone jest w temperaturze 37°C. Dodatkowo, podczas uwalniania leków z materiału, może być zastosowane wymuszone mieszanie płynu. Najczęściej wykorzystywanym płynem jest bufor fosforanowy (*Phosphate Buffered Saline - PBS*), mogący dodatkowo zawierać niewielką ilość surfaktantu tworzącego micelle zdolne zabsorbować uwalniany lek. Przesącz z uwolnionym lekiem jest pobierany w odpowiednich odstępach czasu, a następnie przeprowadzana jest analiza ilościowa badanego składnika. Z uzyskanych danych na temat stężenia, konstruowany jest profil (kumulatywnie) uwolnionej masy leku. Odniesienie uwolnionej masy do całkowitej ilości leku zawartej w materiale, pozwala na określenie kumulatywnego ułamka masy leku uwolnionego w danym czasie. Otrzymane profile uwalniania służą do porównania szybkości uwalniania z materiałów o różnej strukturze, składzie lub morfologii. Charakteryzacji materiałów dokonuje się pod kątem czasu potrzebnego na osiągnięcie plateau uwalniania i jego wartości, wystąpienia początkowego wyrzutu leku (*burst release*) oraz szybkości uwalniania opisaną jako kąt nachylenia stycznej w danym punkcie profilu uwalniania. Stosowanie takiej samej procedury uwalniania danej składnika w każdym z eksperymentów, pozwoliło na wzajemne porównanie otrzymanych

wyników. Dla każdego z profili uwalniania leków (analogów leków) przeprowadzono symulacje numeryczne procesu uwalniania. W trójwymiarowym modelu sorpcji i dyfuzji leków przedstawionym w rozdziale 3.3.2, dopasowywano współczynniki kinetyczne modelu k_a i k_d , tak aby uzyskać jak najbardziej zbliżony przebieg. Wyniki symulacji numerycznych przedstawiono na wykresach w postaci linii ciągłej.

4.1.1. Badanie uwalniania leków lipofilowych

4.1.1.1. Analog leku – Rodamina B

Wstępne badania uwalniania przeprowadzono z wykorzystaniem czynnika fluorescencyjnego - Rodaminy B. Jest to substancja o masie molowej zbliżonej do masy molowej alfa-tokoferolu, leku stosowanego w dalszych badaniach na modelu zwierzęcym. Rozmiar cząsteczki Rodaminy B wynosi 0,9 nm zaś alfa-tokoferolu 0,92 nm. Dzięki takiemu wyborowi analogu alfa-tokoferolu, zapewniono podobieństwo współczynników dyfuzji obu substancji. Zaletą korzystania z analogu leku jest znacznie mniejszy koszt i krótszy czas oznaczania stężenia Rodaminy B w porównaniu do metody oznaczania alfa-tokoferolu. Dodatkowo, zastosowanie składnika fluorescencyjnego umożliwia bardzo szybką analizę mikroskopową rozmieszczenia składnika w nanowłóknach.



Rys. 4.1. Fragment materiału wytworzonego metodą elektroprzędzenia. Materiał elektroprzędzono z roztworu PLC z Rodaminą B.

Do wykonania materiałów wykorzystano trzy polimery różniące czasem degradacji oraz energią oddziaływania z lekiem lub jego analogiem. Oddziaływania te są kluczowe w procesie sorpcji leku na powierzchni nanowłóki. Dla polimerów, których łańcuchy wykazują duże powinowactwo do cząsteczki leku, mogą one znacząco wydłużyć czas uwalniania substancji z nanowłóki. Czas degradacji polimerów według danych

producenta wynosi: 1 – 2 miesiące dla polimeru PDLG, 12 – 24 miesiące dla polimeru PLC oraz więcej niż 24 miesiące w przypadku polimeru PLLA. Wybór najszybciej degradującego polimeru PDLG skutkuje uwolnieniem całej dawki substancji w czasie dwóch miesięcy degradacji polimeru. W przypadku wyboru materiału PLLA, uwolnienie całej dawki obecnej poza powierzchnią nanowłókna, również w jego objętości, będzie możliwe po czasie dłuższym niż 24 miesiące.

Dla jednego z polimerów – PLC, wykonano włókna o mikrostrukturze typu rdzeń w osnowie (Rys. 4.8, 4.14c) Zamknięcie analogu leku w formie rdzenia i osnowy wykonano również dla materiału o wielowarstwowej makrostrukturze (Rys. 4.14e). Rdzeń zawierający analog leku znajdował się w wewnętrznej warstwie zaś osnowę stanowiły dwie warstwy nanowłókien bez leku (materiał typu kanapka). Obie struktury dzięki zastosowaniu osnowy bez analogu leku, miały za zadanie spowolnić proces uwalniania względem materiału o typowej monolitycznej strukturze leku we włóknie. Mikrostrukturę materiału zmieniano również poprzez ukierunkowanie nanowłókien, dzięki czemu starano się wpłynąć na proces dyfuzji składnika w porach materiałów i pośrednio na proces sorpcji na powierzchni nanowłókien (Rys. 4.4, 4.14.d)

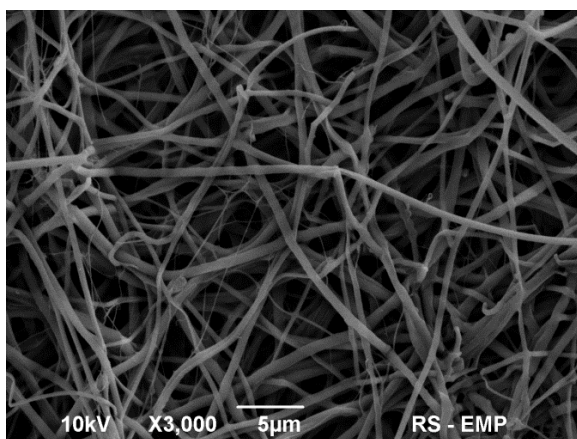
Parametry elektroprzędzenia były takie same dla każdego ze standardowych i warstwowych materiałów tzn. natężenie objętościowe przepływu roztworu polimeru przez dyszę wynosiło $Q = 800 \mu\text{l/h}$. W przypadku elektroprzędzenia w układzie typu rdzeń w osnowie natężenie objętościowe roztworu rdzenia wynosiło $Q_1 = 800 \mu\text{l/h}$ zaś roztworu osnowy $Q_2 = 1500 \mu\text{l/h}$. Różnica potencjałów pomiędzy dyszą a kolektorem w każdym z przypadków wynosiła 1 kV/cm zaś odległość 15 cm . W zależności od warunków, nieznacznie zmieniano te parametry aby uzyskać lepszą stabilność elektroprzędzenia. Uwalnianie prowadzono w temperaturze 37°C , do roztworu buforu fosforanowego PBS symulującego środowisko komórkowe.

Tab. 4.1. Parametry badanych materiałów zawierających Rodaminę B.

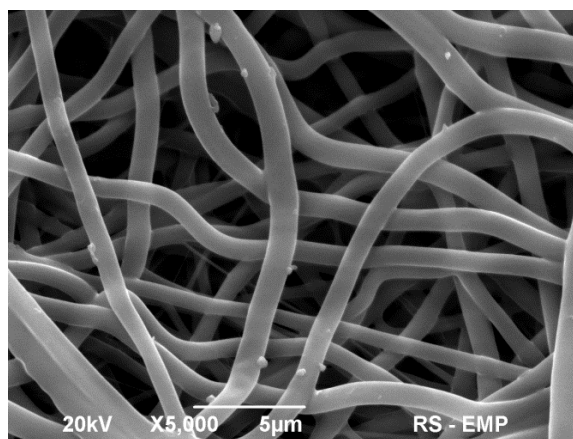
Nr materiału	Polimer	Zawartość Rod. B wzgl. polimeru (% wag.)	Dodatkowe cechy	Porowatość (-)	Kąt zwilżania (°)	Grubość nanowłókien (μm)
MR1	PLLA	2,7	Stand. mat. o włóknach uł. przypadkowo	0,70	134 \pm 10	0,50 \pm 0,18
MR2	PLC	2,8	Stand. mat. o włóknach uł. przypadkowo	0,60	111 \pm 8	0,79 \pm 0,23
MR3	PDLG	2,8	Ukierunkowane włókna	0,55	117 \pm 8	0,55 \pm 0,15
MR4	PDLG	4,4	Stand. mat. o włóknach uł. przypadkowo	0,50	113 \pm 9	0,53 \pm 0,18
MR5	PLC	2,7	Mat. typu kanapka	0,40	109 \pm 8	1,42 \pm 0,47
MR6	PLC	1,0	Rdzeń w osnowie	0,35	119 \pm 9	3,77 \pm 1,50
MR7	PLLA	1,4	Stand. mat. o włóknach uł. przypadkowo	0,70	143 \pm 11	0,92 \pm 0,30
MR8	PLLA	2,8	Ukierunkowane włókna	0,60	141 \pm 10	0,87 \pm 0,40
MR9	PDLG	2,8	Stand. mat. o włóknach uł. przypadkowo	0,75	125 \pm 8	0,92 \pm 0,44
MR10	PDLG	1,1	Stand. mat. o włóknach uł. przypadkowo	0,75	123 \pm 9	0,61 \pm 0,20

Analiza mikroskopowa nanowłókien z Rodaminą B

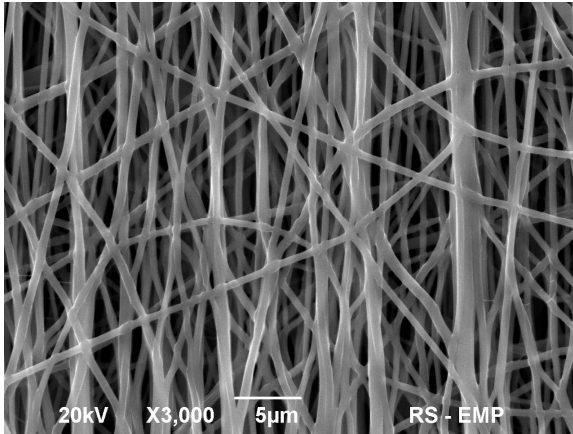
Materiały z nanowłókien wykonane standardową techniką elektroprzędzenia charakteryzowały się stosunkowo gęstym upakowaniem nanowłókien w materiale o porowatości nie przekraczającej 75%. Nie zaobserwowano defektów nanowłókien w postaci lokalnych zgrubień (koralików na włóknie). W każdym ze standardowych materiałów zaobserwowano prawidłową morfologię włókniny. Średnią grubość otrzymanych nanowłókien w poszczególnych materiałach przedstawiono w Tab. 4.1. Można zaobserwować iż w przypadku elektroprzędzenia w układzie rdzeń – osnowa, średnia grubość nanowłókien jest nawet sześciokrotnie większa niż dla materiałów wykonanych standardową techniką elektroprzędzenia. Jest to spowodowane zwiększonym natężeniem objętościowym przepływu roztworów rdzenia i osnowy $Q = Q_1 + Q_2 = 2300 \mu\text{l/h}$ w stosunku do standardowej techniki elektroprzędzenia gdzie $Q = 800 \mu\text{l/h}$.



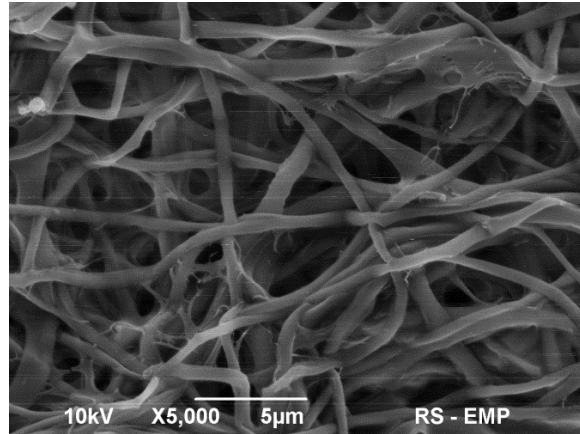
Rys. 4.2. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLLA (MR1). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.



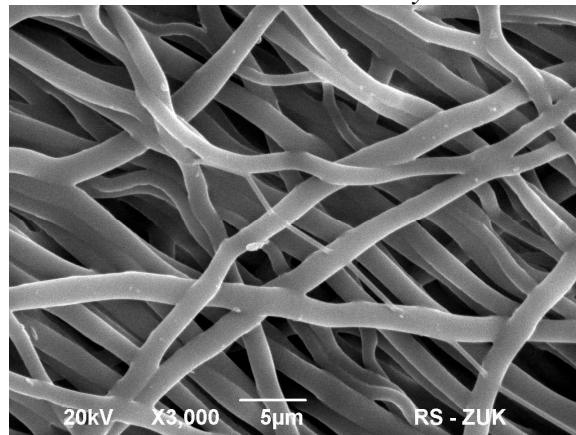
Rys. 4.3. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MR2). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.



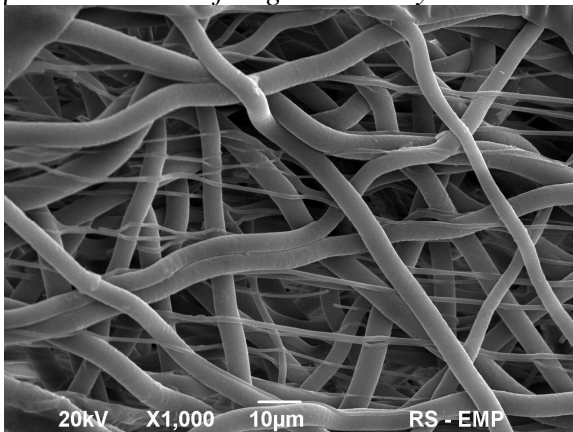
Rys. 4.4. Obraz mikroskopii SEM powierzchni ukierunkowanych nanowłókien polimeru PDLG (MR3).



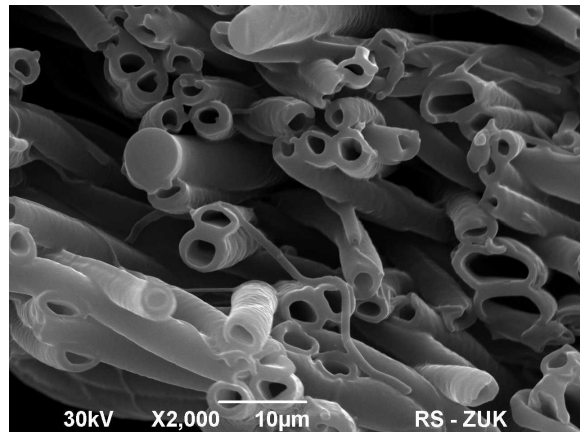
Rys. 4.5. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MR4). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.



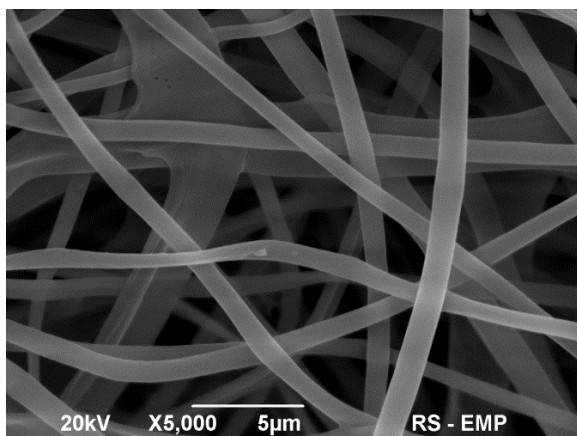
Rys. 4.6. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MR5). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.



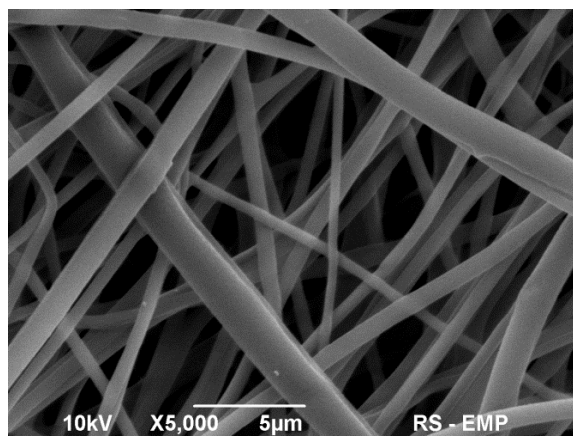
Rys. 4.7. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien typu rdzeń w osnowie (MR6). Materiał wykonano z polimeru PLC. Widoczna obecność znacznie cieńszych włókien powstałych podczas wtórnego elektroprzędzenia ze strugi polimeru.



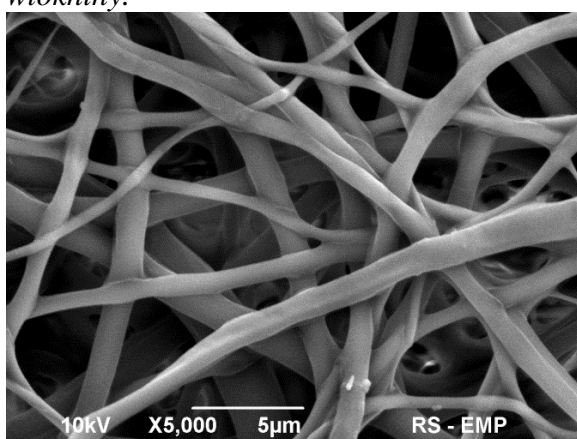
Rys. 4.8. Obraz mikroskopii SEM przekroju nanowłókien typu rdzeń w osnowie (MR6). Zmierzona grubość osnowy wynosi $d_{osn} = 1,01 \pm 0,25 \mu\text{m}$.



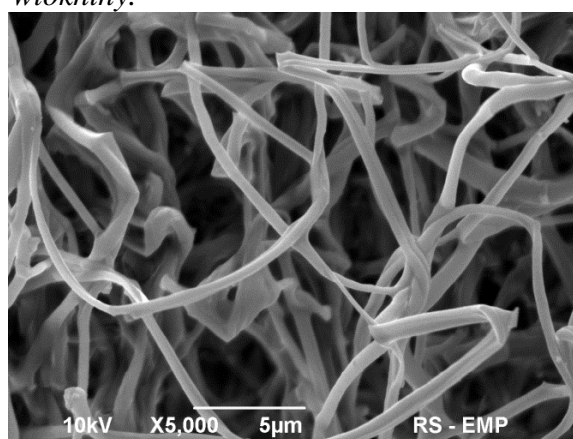
Rys. 4.9. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLLA (MR7). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.



Rys. 4.10. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLLA (MR8). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.



Rys. 4.11. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MR9). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.

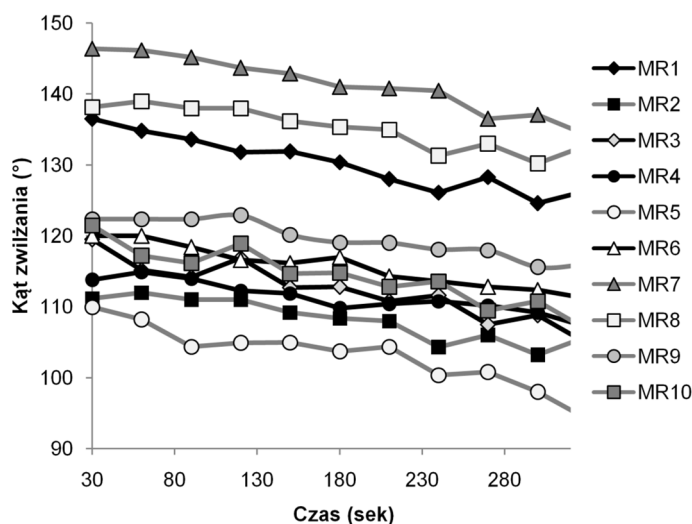


Rys. 4.12. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MR10). Widoczne częściowe sklejenie włókien.

Pomiar zwilżalności materiałów z Rodaminą B

Jedną z właściwości materiałów polimerowych mających wpływ na proces uwalniania leków jest jego zwilżalność przez płyn omywający nanowłókna. Do oceny oddziaływań woda – materiał polimerowy zastosowano metodę pomiaru kąta zwilżania pomiędzy materiałem a kroplą wody (Rys. 4.13). Materiały wykonane z polimeru PLLA cechowały się najwyższą wartością kąta zwilżania (140-150°). Zwilżalność materiałów z PDLG była niższa i wynosiła około 120°, zaś najniższą zwilżalność wykazywały materiały z PLC (110°). Zwilżalność wszystkich materiałów malała liniowo, z niemal jednakową szybkością (porównaj materiały MR1-MR10, Rys. 4.13). Pomiar kąta zwilżania materiałów z nanowłókien PLLA wskazuje na superhydrofobowość materiału, jednakże należy mieć na uwadze fakt zwiększenia hydrofobowości materiału przez obecne w jego porach powietrze.

Jest to jak się uważa główna przyczyna obserwowanej super-hydrofobowości w innych materiałach.

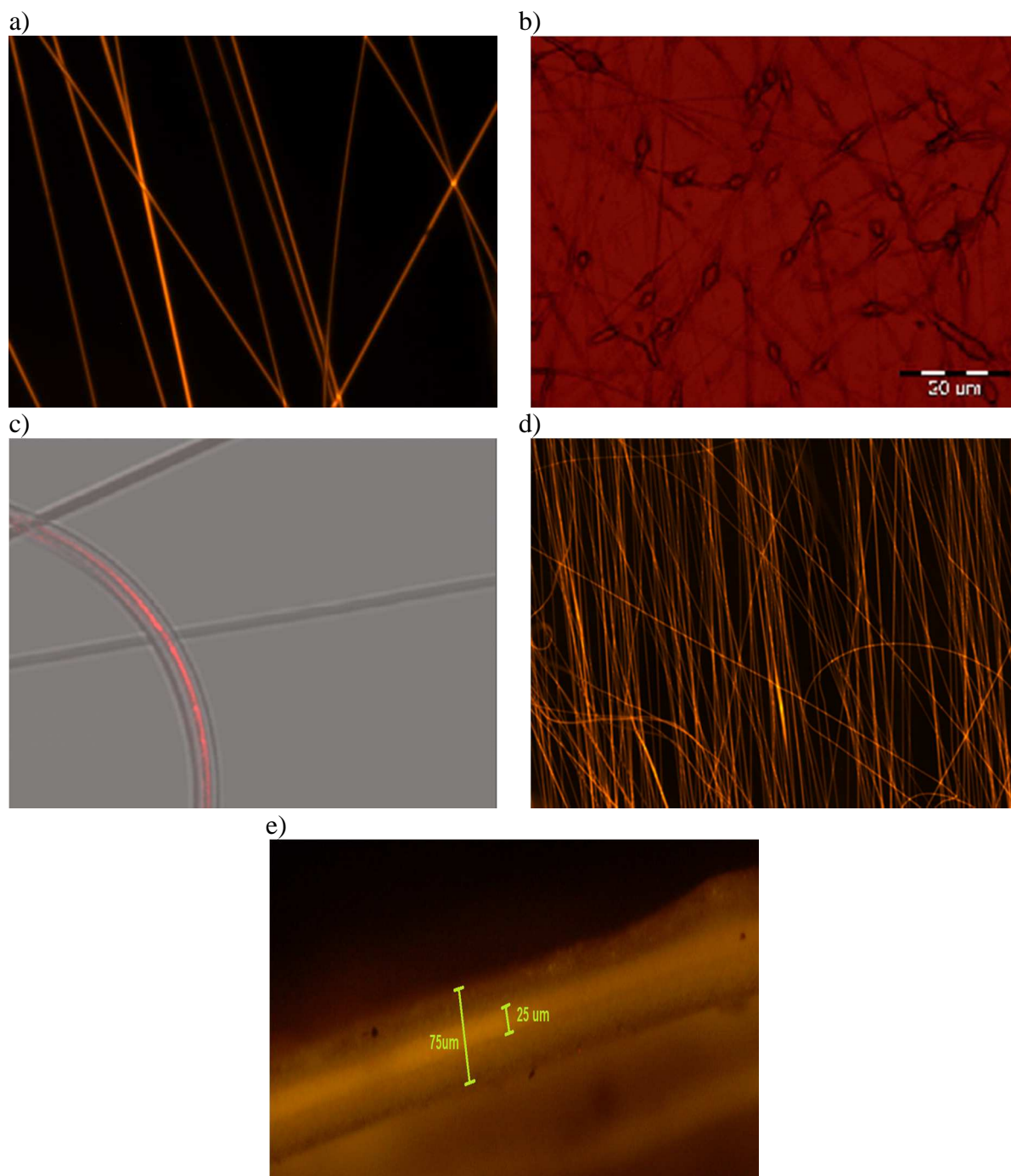


Rys. 4.13. Zmiana kąta zwilżania w czasie dla materiałów zawierających Rodaminę B. Maksymalny błąd pomiaru dla trzech powtórzeń wynosił 8%.

Ocena rozmieszczenia Rodaminy B we włóknach

Zebrane podczas elektroprzędzenia nanowłókna obserwowano pod mikroskopami fluorescencyjnym oraz konfokalnym. Metoda ta pozwalała na wstępne wyselekcjonowanie materiałów charakteryzujących się właściwą jakością nanowłókien. Do dalszej części badań wybierano nanowłókna które charakteryzowały się jednorodną jasnością fluorescencji Rodaminy B na całej długości włókna, wskazującą na jej homogeniczne rozmieszczenie wewnątrz oraz na powierzchni włókien (Rys. 4.14a).

W przypadku elektroprzędzenia w układzie typu rdzeń w osnowie, gdzie roztwór Rodaminy B w wodzie miał stanowić rdzeń nanowłókna nie zaobserwowano tworzenia się rdzenia w osnowie polimeru PLC (w niniejszej pracy nie przedstawiono wyników uwalniania składnika ani analizy SEM). Podczas elektroprzędzenia, pod dyszą zaobserwowano zaś przemieszczające się kropelki roztworu rdzenia w dużej kropli roztworu polimeru PLC. Obserwowane pod mikroskopem włókna zawierały dużą liczbę zgrubień (koralików) na włóknach w których znajdowała się Rodamina B (Rys. 4.14b). Niewielki dodatek polimeru PEO (4% wag. względem roztworu rdzenia) zwiększył lepkość roztworu rdzenia oraz zmniejszył napięcie powierzchniowe pomiędzy roztworami powodując łatwiejsze rozciąganie strugi roztworu rdzenia wewnątrz kropli polimeru. Dla omówionego przypadku z dodatkiem zwiększającego lepkość polimeru, w mikroskopii konfokalnej zaobserwowano nieprzerwane włókna typu rdzeń w osnowie (Rys. 4.14c). Te same włókna w mikroskopii elektronowej przedstawiono na rysunku 4.8.



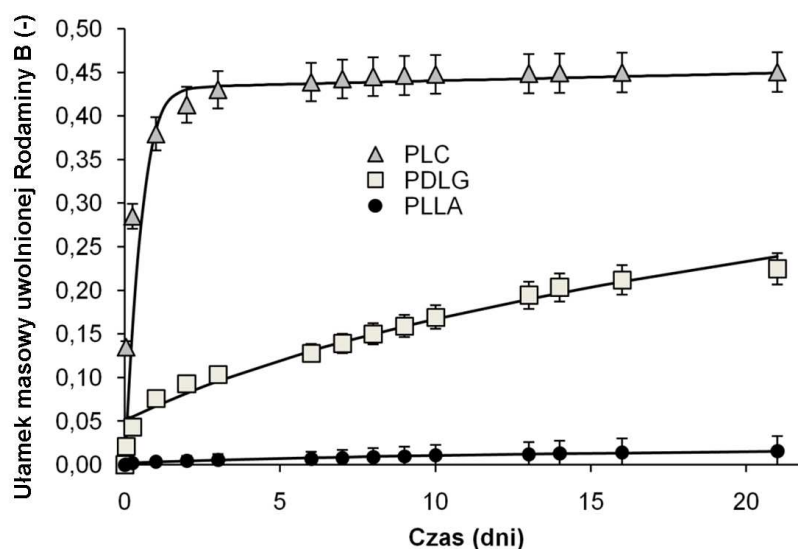
Rys. 4.14. Mikroskopia fluorescencyjna rodaminy B obecnej w nanowłóknach. a) Typowe obrazy fluorescencji w prawidłowo przygotowanych nanowłóknach. b) Nanowłókna przędzone w układzie rdzeń – osnowa z widocznymi koralikami fazy wodnej c) Mikroskopia konfokalna rodaminy B w nanowłóknie wytworzonym techniką rdzeń - osnowa d) Ukierunkowanie nanowłókien w materiale e) Przekrój trójwarstwowego materiału. Środkowa warstwa zawiera Rodaminę B. Nanowłókna na rysunkach a-d zbierano na szkiełka mikroskopowe.

Wyniki uwalniania Rodaminy B

Przebieg uwalniania Rodaminy B dla zmierzonych w układzie z rozdziału 2.11, materiałów przedstawionych w tabeli 4.1. przedstawiono na rysunkach 4.16 – 4.21. Wykresy

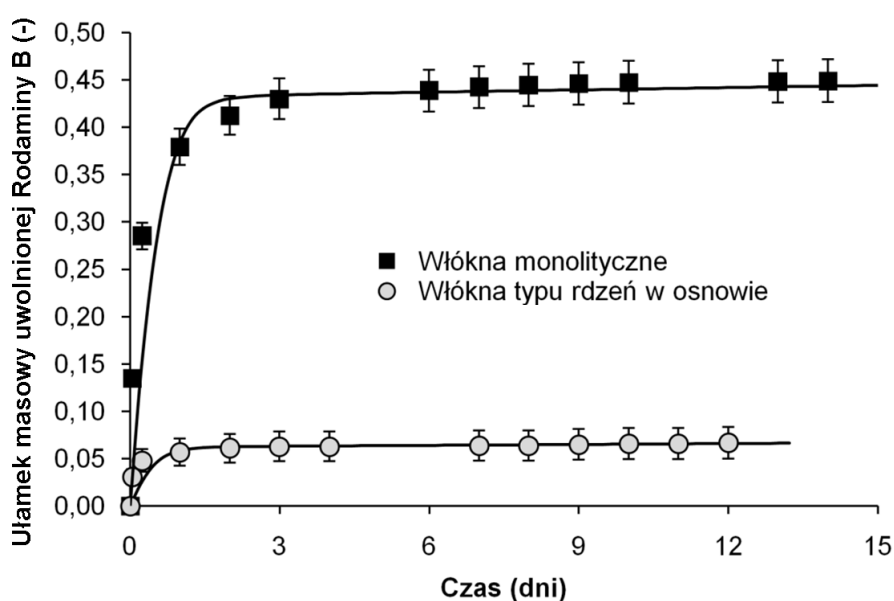
przedstawiają kumulatywnie uwolnioną masę analogu, odniesioną do całkowitej masy Rodaminy B obecnej w materiale, dla różnych parametrów geometrycznych oraz różnego składu nanowłókien.

Na rysunku 4.15 zaprezentowano wynik uwalniania analogu leku z trzech materiałów wykonanych z polimerów: PLC, PDLG, PLLA. Stężenie początkowe Rodaminy B w każdym z materiałów było takie samo i wynosiło około 2,7%. Uwalnianie Rodaminy B obecnej w materiale PLC (MR2), po 3-4 dniach osiągnęło plateau, po uwolnieniu blisko połowy początkowej zawartości barwnika w materiale. Dalsze uwalnianie Rodaminy B przebiegało ze znacznie mniejszą szybkością i jest uzależnione od szybkości degradacji polimeru. Materiał z rodaminą w nanowłóknach PDLG (MR9) wykazał minimalne początkowe uwolnienie 5% dawki barwnika w materiale i dalsze bliskie liniowemu uwalnianie składnika. Najwolniejsze uwalnianie Rodaminy B osiągnięto dla materiału z PLLA (MR1). Może to być związane ze słabym zwilżaniem nanowłókien przez penetrujący pory materiału wodny roztwór buforu fosforanowego PBS. Dodatkowo efekt ten może być spotęgowany znacznie mocniejszymi oddziaływaniami Rodamina B – polimer, powodując wolniejszą desorpcję leku z powierzchni polimeru. Obserwacje różnic szybkości uwalniania tego samego barwnika z różnych polimerów potwierdzają profile uwalniania otrzymywane w literaturze, gdzie w przypadku PLLA do przyspieszenia uwalniania dowolnych cząsteczek leków stosowano w buforze enzymy wspomagające degradację tego polimeru [44].



Rys. 4.15. Profil uwalniania Rodaminy B z trzech materiałów sporządzonych z polimerów: PLC (MR2), PDLG (MR9) oraz PLLA (MR1). Linia ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Na rysunku 4.16 przedstawiono wpływ struktury nanowłókna na przebieg uwalniania Rodaminy B. Zauważalne jest blisko dziewięciokrotne zmniejszenie wysokości plateau uwalniania dla nanowłókien typu rdzeń w osnowie (MR6) w porównaniu do standardowych nanowłókien (MR2). W przypadku materiałów z wewnętrzną strukturą rdzenia, podczas obserwacji mikroskopowych, w niektórych miejscach zauważalne było wylewanie zawartości rdzenia wokół włókien. Prawdopodobną przyczyną było częściowe pęknięcie tego typu struktur umożliwiające szybkie wydostanie się zawartości rdzenia do roztworu, jednakże nie zauważono żadnych zmian na powierzchni nanowłókien podczas obserwacji SEM (Rys. 4.7). Zjawisko te dostrzeżono również w literaturze, prezentując modyfikacje równań uwalniania leków uwzględniające mikropęknięcia [28]. Transport składnika przez pory obecne w osnowie polimeru spowolnił proces uwalniania składnika do ośrodka symulującego płyn fizjologiczny. Dzięki temu otrzymany materiał pozwala na skuteczną kontrolę uwalniania i nawet kilkumiesięczne dawkowanie leku np. w miejscu uszkodzenia tkanki.

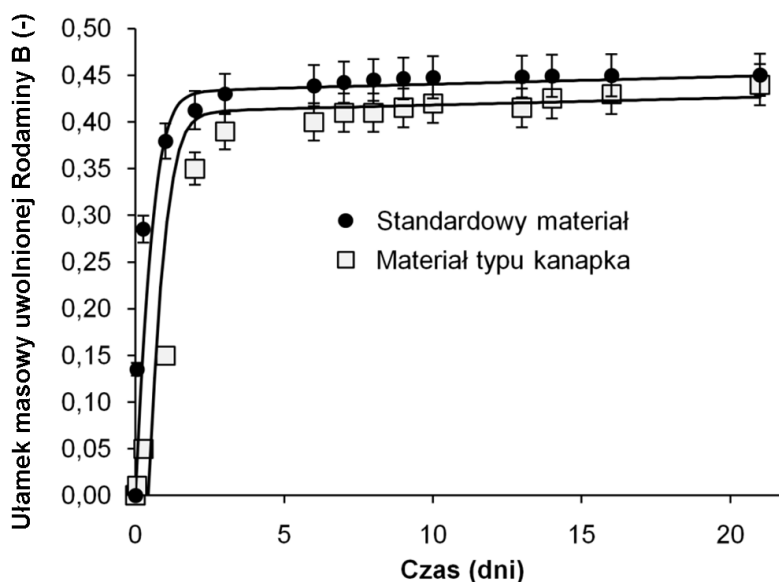


Rys. 4.16. Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PLC o strukturze włókien monolitycznych (MR2) oraz włókien typu rdzeń w osnowie (MR6). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Porównanie wyników uwalniania ze standardowego materiału (MR2) z wielowarstwowym (MR5) pokazuje niewielkie opóźnienie w uwalnianiu Rodaminy B oraz zmniejszenie wielkości początkowego wyrzutu składnika z materiału (Rys. 4.17). Jest to spowodowane większą odległością dyfuzji składnika przez warstwy materiału bez

rodaminy. Dodatkowo, widoczne jest obniżenie wysokości uwalniania, spowodowane w większym stopniu zmianą w morfologii włókniny aniżeli samą strukturą makroskopową.

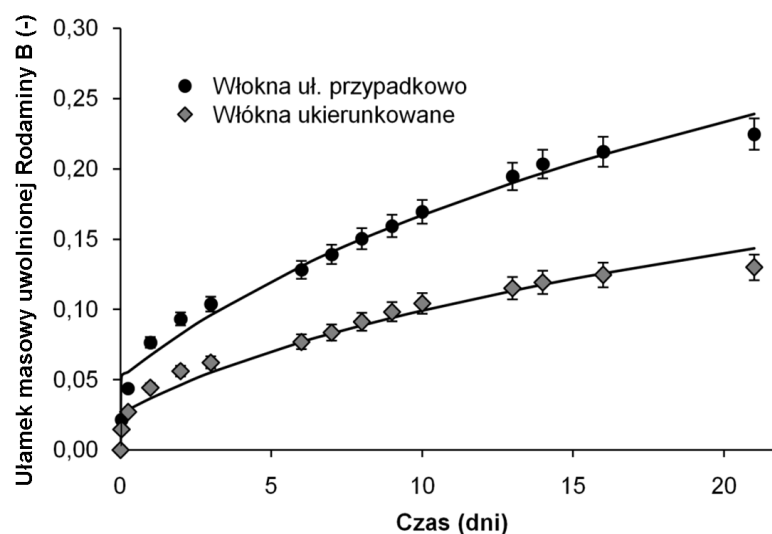
Wyniki uwalniania z materiału o nanowłóknach ułożonych przypadkowo (MR9) porównano z włókniną o włóknach ukierunkowanych (MR3) (porównaj Rys. 4.4 i 4.14d z 4.2). Zaobserwowano półtorakrotny spadek ilości uwolnionej substancji po 21 dniach uwalniania z materiału PDLG o włóknach ukierunkowanych (Rys. 4.18). W przypadku uwalniania z nanowłókien PLLA (Rys. 4.19) różnice w szybkościach uwalniania po 21 dniach nie różniły się tak, jak w przypadku nanowłókien PDLG. W ciągu pierwszych 8 dni materiał o włóknach ukierunkowanych (MR8) uwolnił mniej Rodaminy B niż materiał o nanowłóknach ułożonych przypadkowo (MR1), niemniej jednak po około 10 dniach szybkość uwalniania wzrosła niwelując różnicę.



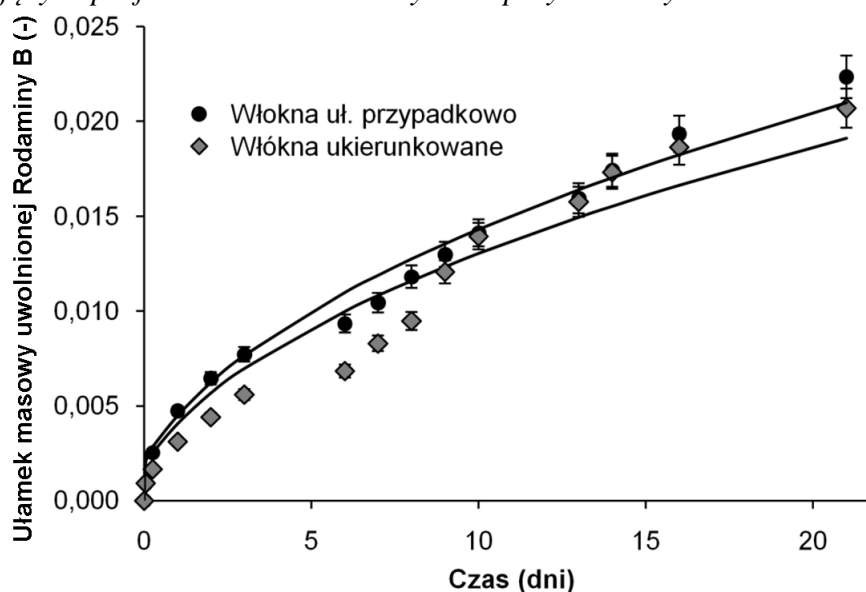
Rys. 4.17. Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PLC o różnej budowie makroskopowej. Materiał standardowy (MR2) posiadał substancję fluorescencyjną we wszystkich włóknach. Materiał typu kanapka (MR5) (tej samej grubości co materiał standardowy) zawierał Rodaminę B w środkowej warstwie materiału. Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Dopasowanie krzywej uwalniania w modelu mikroskopowym (uproszczonym) dla danych eksperymentalnych uwalniania z materiału o włóknach ukierunkowanych jest znacznie mniej dokładne z uwagi na brak możliwości uwzględnienia skokowego wzrostu szybkości uwalniania w modelu numerycznym. Materiały o włóknach ukierunkowanych są gęściej upakowane niż materiały z włóknami ułożonymi przypadkowo (np. z 0,75 do 0,55 dla PDLG por. Tab.4.1). Z tego powodu spadek porowatości tych struktur może prowadzić

do spowolnienia uwalniania substancji z materiału co zaobserwowały w ostatnim czasie również inne grupy badawcze [77].

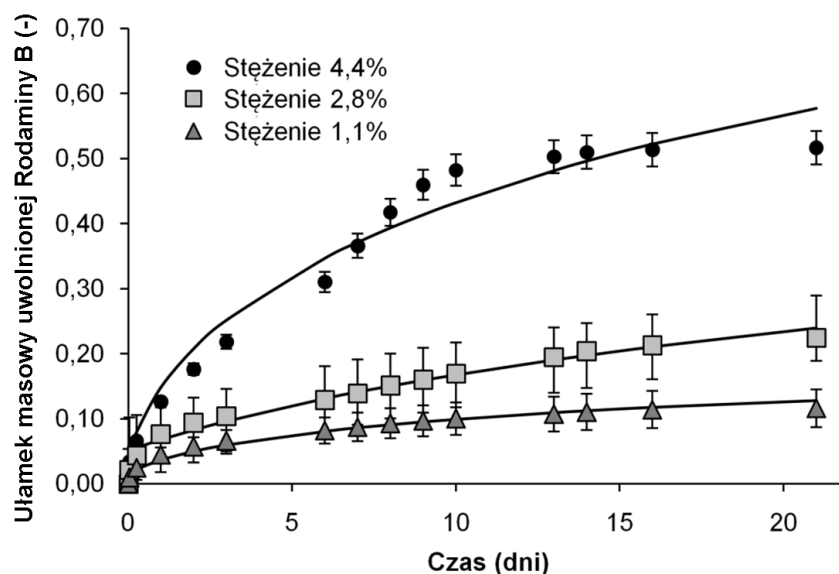


Rys. 4.18. Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PDLG o strukturze włókien: ułożonych przypadkowo w materiale (MR9) oraz ukierunkowanych (MR3). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

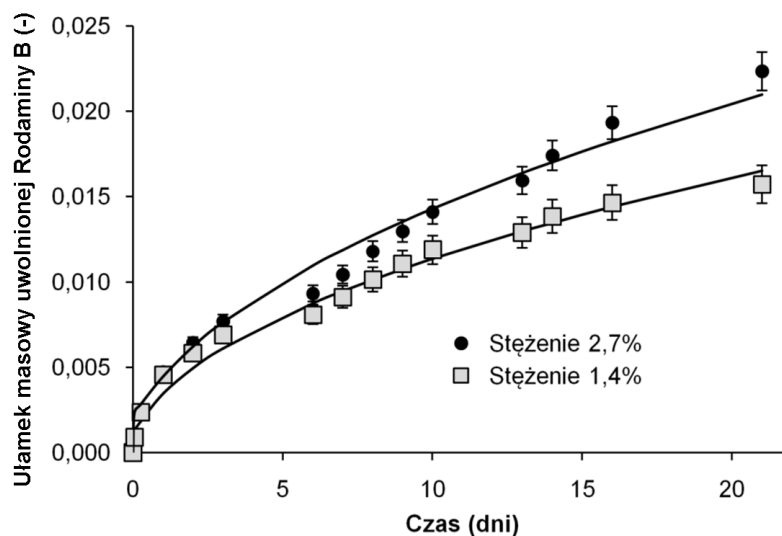


Rys. 4.19. Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PLLA o strukturze włókien: ułożonych przypadkowo w materiale (MR1) oraz ukierunkowanych (MR8). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Ostatnie porównanie dotyczyło materiałów o różnym stężeniu początkowym Rodaminy B w nanowłóknach (Rys. 4.20). W przypadku materiału z PDLG oraz PLLA, zaobserwowano wzrost szybkości uwalniania barwnika wraz ze wzrostem jego zawartości w nanowłóknach. Jest to spowodowane wzrostem siły napędowej i w konsekwencji wzrostem szybkości uwalniania. Czterokrotne zwiększenie stężenia Rodaminy B we włóknie z 1,1% wag. (MR10) do 4,4% wag. (MR4) w przypadku materiału z PDLG doprowadziło do pięciokrotnego zwiększenia wartości uwolnionej substancji w porównywanych przypadkach. Jednocześnie, w przypadku materiału o wyższym stężeniu zaobserwowano znaczne spowolnienie uwalniania w 13 dniu eksperymentu. Różnica szybkości uwalniania z materiałów PLLA o różnym stężeniu Rodaminy B (MR1, MR7), nie była znacząca (Rys. 4.21). Należy również zauważyć iż po 21 dniach uwalniania, kumulatywnie uwolniona masa Rodaminy B z materiałów wynosiła jedynie 2% dostępnej w materiale dawki składnika.



Rys. 4.20. Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PDLG zawierających różne stężenie substancji fluorescencyjnej: 4,4% wag. (MR4), 2,8% wag. (MR9) oraz 1,1% wag. (MR10) względem masy polimeru. Linia ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.



Rys. 4.21. Profil uwalniania Rodaminy B z materiałów PLLA zawierających różne stężenie substancji fluorescencyjnej: 2,7% wag. (MR1) oraz 1,4% wag. (MR7) względem masy polimeru. Liniją ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

4.1.1.2. Lek hydrofobowy– alfa-tokoferol

Po przeprowadzonej serii eksperymentów uwalniania Rodaminy B z polimerów PLC, PDLG oraz PLLA i rozważeniu korzyści wynikających z zastosowania poszczególnych struktur (ukierunkowane nanowłókna, rdzeń w osnowie, materiał wielowarstwowy) do dalszych badań z alfa-tokoferolem wybrano polimer PLC o standardowej strukturze nanowłókien. Wybrany polimer charakteryzuje się najniższą energią oddziaływań analog leku – polimer (Rys. 4.15), dzięki czemu zaobserwowano uwolnienie 45% początkowej masy analogu leku zawartego w materiale w czasie 21 dni eksperymentu. Wybór polimeru PLC o pośredniej szybkości degradacji (12 – 24 miesiące) w stosunku do polimeru PLLA i PDLG jest korzystny ze względu na niższe stężenie produktów degradacji polimeru, mogące niekorzystnie oddziaływać na komórki tkanki nerwowej.

Alfa-tokoferol ma właściwości antyoksydacyjne, a jego rolą w organizmie jest ochrona komórek przed czynnikami wywołanymi stresem oksydacyjnym i powodującymi uszkodzenia jej składników. Podczas elektroprzędzenia oraz przechowywania materiału na powietrzu aktywność alfa-tokoferolu ulega zmniejszeniu. Z tego względu, pierwszy wykonany materiał zawierał 15% wag. leku względem masy polimeru, co miało zapewnić znaczną dawkę leku w formie aktywnej tuż przed aplikacją materiału na tkance modelu zwierzęcego. Alfa-tokoferol w postaci płynnej dodano do roztworu polimeru i uzyskano

homogeniczny roztwór polimeru z lekiem o stężeniach przedstawionych w tabeli 4.2. Wszystkie materiały z alfa-tokoferolem przygotowano dla takich samych parametrów procesowych. Natężenie objętościowe roztworu polimeru wynosiło $Q = 800 \mu\text{l/h}$, różnica potencjałów pomiędzy dyszą a kolektorem wynosiła 1 kV/cm , zaś odległość 15 cm . Uwalnianie prowadzono w temperaturze 37°C , do roztworu micelnarnego (0,5% dodecylosulfonianu sodowego SDS) symulującego środowisko komórkowe. Ilościowe pomiary procesu uwalniania wykonano wg procedury opisanej w rozdziale 2.5.

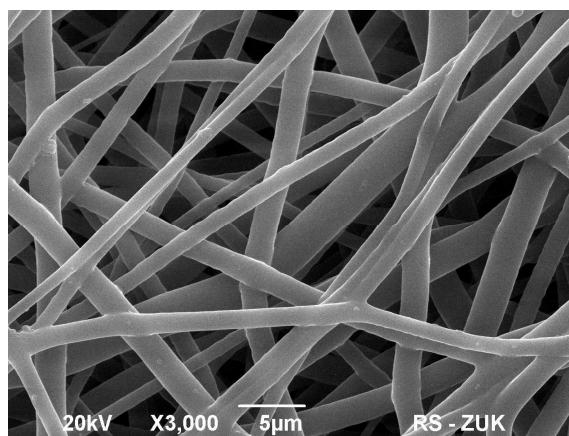
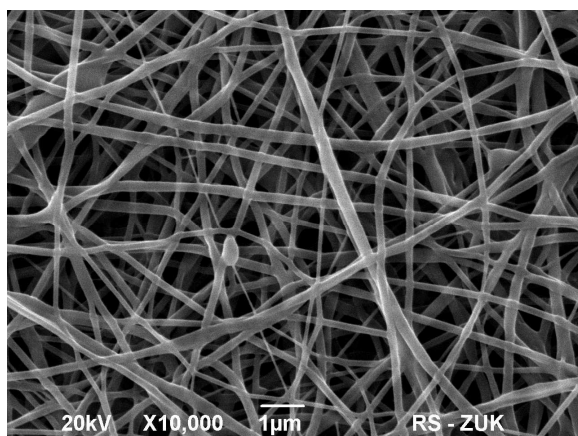
Warto zauważyć, że zwilżalność materiałów z polimeru PLC zawierających alfa-tokoferol była większa niż w przypadku podobnego materiału z analogiem leku i nieznacznie rosła ze wzrostem zawartości alfa-tokoferolu w nanowłóknach (Tab.4.2).

Tab.4.2. Parametry badanych materiałów zawierających alfa-tokoferol.

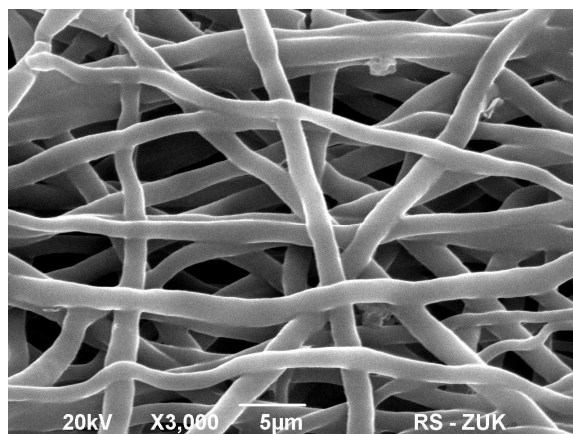
Nr materiału	Polimer	Zawartość alfa-tokoferolu wzg. polimeru (% wag.)	Kąt zwilżania ($^\circ$)	Grubość nanowłókien (μm)
MT1	PLC	5%	124 ± 10	$0,20 \pm 0,07$
MT2	PLC	10%	131 ± 8	$1,21 \pm 0,50$
MT3	PLC	15%	132 ± 9	$1,45 \pm 0,40$

Analiza mikroskopowa nanowłókien z alfa-tokoferolem

Na zdjęciach mikroskopii elektronowej przedstawiono powierzchnię nanowłókien (Rys. 4.22 - 4.24). Nie zaobserwowano defektów włókien w postaci zgrubień (koralików) lub posklejania. Grubość włókien była jednolita. Średnia grubość włókien w materiale zawierającym najniższą zawartość alfa-tokoferolu była najmniejsza i wynosiła $200 \pm 70 \text{ nm}$.



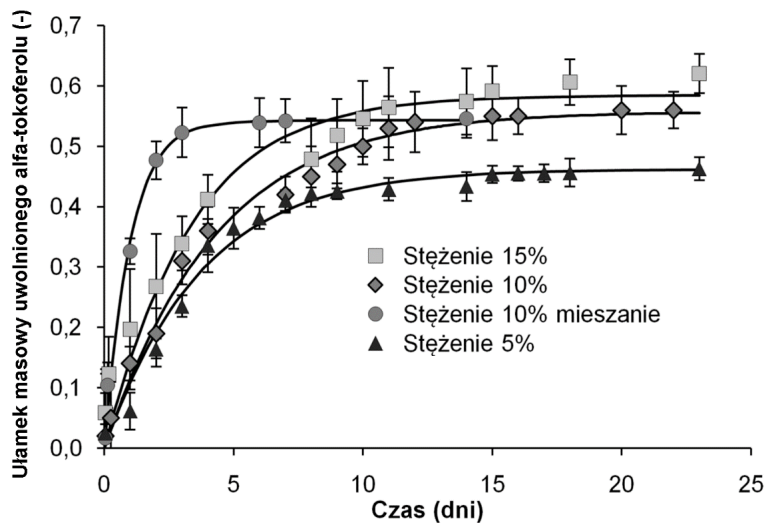
Rys. 4.22. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC zawierających 5% alfa-tokoferolu (MT1). Rys. 4.23. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC zawierających 10% alfa-tokoferolu (MT2).



Rys. 4.24. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC zawierających 15% alfa-tokoferolu (MT3).

Wyniki uwalniania alfa-tokoferolu

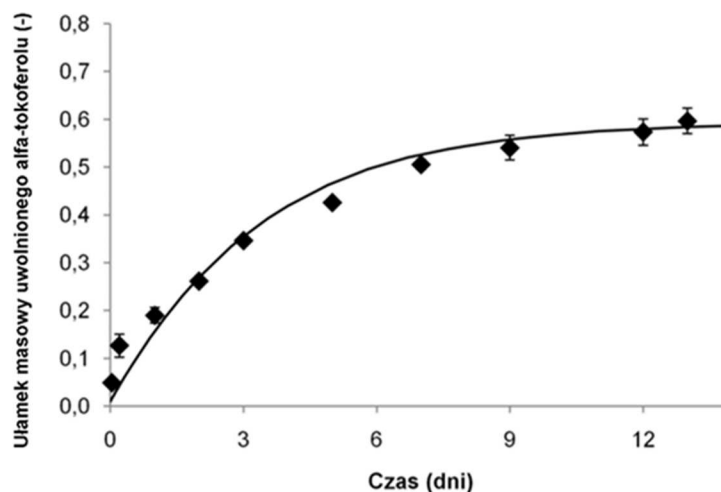
Materiał o zawartości 15% wag. alfa-tokoferolu względem polimeru (MT3) uwalniał substancję aktywną przez okres trzech tygodni (Rys. 4.25). Po tym czasie nanowłókna zawierały nadal około 40% wag. alfa-tokoferolu. Szybkość uwalniania alfa-tokoferolu malała z czasem z uwagi na spadek siły napędowej. Dla materiału wykonano dodatkowe badania pod kątem powtarzalności uwalniania procesu uwalniania. Materiał po sterylizacji tlenkiem etylenu został przekazany do Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej (IMDiK) celem wstępnych badań na modelu zwierzęcym. Wyniki eksperymentów pilotażowych wskazały możliwość wystąpienia obrzęku tkanki mózgowej. Z tego powodu zdecydowano się na zmniejszenie początkowej ilości alfa-tokoferolu w materiale. Wyprodukowano kolejne materiały o zawartości 10% wag. i 5% wag. alfa-tokoferolu względem masy polimeru. Wyniki uwalniania po trzech tygodniach eksperymentów wykazały, iż w przypadku materiału o 10% wag. leku, w materiale pozostało 45% początkowej ilości alfa-tokoferolu zaś w przypadku materiału o 5% wag. – 55% (Rys. 4.25). Przebieg profili uwalniania dla każdego z materiałów był podobny, zaś czas znacznego spowolnienia uwalniania w każdym przypadku nastąpił około 11 dnia eksperymentu. Materiał o zawartości 10% wag. alfa-tokoferolu poddano również zmodyfikowanej procedurze uwalniania. Zanurzony w ośrodku symulującym środowisko komórkowe materiał mieszano przez cały czas trwania eksperymentu. Zaobserwowano przyspieszenie uwalniania tej samej dawki antyoksydantu w porównaniu do materiału uwalnianego w standardowych warunkach, różnica w czasie uwalniania wyniosła około 12 dni.



Rys. 4.25. Profil uwalniania alfa-tokoferolu z materiałów o różnych początkowych zawartościach leku w materiale: 5% (MT1), 10% (MT2), 5% (MT3). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Badanie powtarzalności procesu elektroprzędzenia

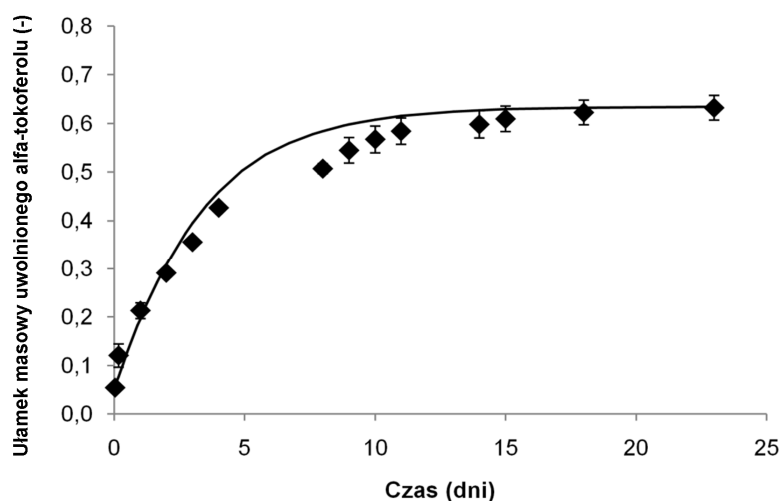
Przeprowadzono dodatkowe eksperymenty mające na celu zbadanie powtarzalności procesu elektroprzędzenia i wytwarzania materiałów zawierających lek. Badania nad kontrolą powtarzalności wynikały z faktu dużej zmienności typowej dla procesu elektroprzędzenia, gdzie nieznaczna zmiana warunków otoczenia może mieć znaczny wpływ na strukturę materiału, a tym samym szybkość uwalniania leku. Uzyskane dane pozwoliły stwierdzić, że dla takich samych warunków procesowych, a także materiałowych, możliwe jest uzyskanie zbliżonych profili uwalniania alfa-tokoferolu.



Rys. 4.26. Wpływ powtarzalności elektroprzędzenia na profil uwalniania alfa-tokoferolu. Porównano trzy takie same materiały wytworzone w różnym czasie. Punkty przedstawiają uśrednione wartości trzech pomiarów. Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Badanie wpływu sterylizacji na proces uwalniania alfa-tokoferolu

Sprawdzono wpływ sterylizacji materiału polimerowego z alfa-tokoferolem na proces uwalniania. Materiał poddano sterylizacji tlenkiem etylenu według procedur Zakładu Sterylizacji Szpitala Bielańskiego w Warszawie. Nie wykazano znaczących różnic w profilu uwalniania alfa tokoferolu w materiale bez i po sterylizacji.



Rys. 4.27. Wpływ sterylizacji tlenkiem etylenu na profil uwalniania alfa-tokoferolu. Porównano dwa fragmenty tego samego materiału. Punkty przedstawiają uśrednione wartości pomiarów. Linia ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Wnioski

Otrzymane wyniki badań uwalniania alfa-tokoferolu skonsultowano ze współpracownikami z IMDiK (prof. M Frontczak-Baniewicz, dr D. Sulejczak) i stwierdzono iż stopniowe uwalnianie dawki leku według otrzymanych profili może przyczynić się do korzystnej odbudowy tkanki nerwowej po uszkodzeniu neurochirurgicznym. Uwolnienie około połowy dawki leku zawartego w materiale przez okres 23 dni i stopniowe wyhamowanie uwalniania zapewnią stałe dostarczanie alfa-tokoferolu do uszkodzonej tkanki przez wiele miesięcy od implantacji materiału. Ważnym parametrem odpowiedzialnym za procesy naprawcze w tkance jest stężenie alfa-tokoferolu w materiale, gdzie dla materiału o 15% wag. zawartości leku w badaniach pilotażowych zaobserwowano możliwość wystąpienia niekorzystnego obrzęku tkanki nerwowej. Przeprowadzone badania powtarzalności elektroprządzenia oraz aktywności posterylizacyjnej wykazały zachowanie należytych parametrów materiału niezbędnych do wytworzenia opatrunku służącego do neuroprotekcji tkanki nerwowej.

4.1.2. Badania nad uwalnianiem leków hydrofilowych

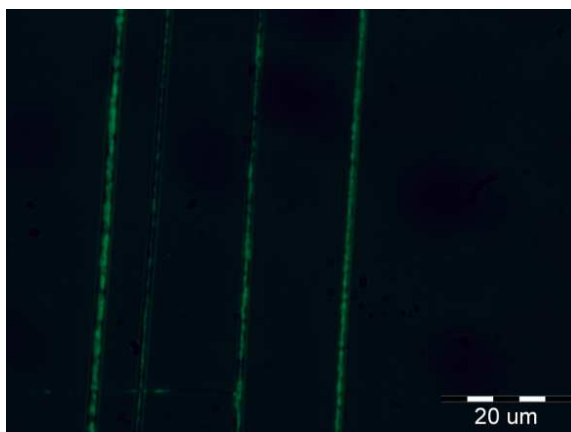
4.1.2.1. Analog leku – BSA-FITC

Wstępne badania materiałów zawierających substancje białkowe prowadzono z włókien otrzymywanych w procesie elektroprzędzenia emulsji oraz z włókien typu rdzeń w osnowie polimerowej. Analogiem stosowanych w badaniach na małym modelu zwierzęcym czynników wzrostu NGF i BDNF (rozmiar białka $r_m = 2,6$ nm) była albumina surowicy wołowej sprzężoną z izotiocyjanianem fluoresceiny (BSA-FITC), której rozmiar wynosi około 3,6 nm. Docelowo albumina surowicy wołowej (bez barwnika) może być użyta jako czynnik osłaniający czynniki wzrostu przed denaturacją.

Podobnie jak w przypadku Rodaminy B i alfa-tokoferolu, do wykonania materiałów wykorzystano trzy polimery różniące się czasem degradacji. Zawarte w nanowłóknie krople fazy wodnej mogą przyczynić się w każdym przypadku do zwiększenia szybkości degradacji materiałów (w porównaniu do materiałów z lekami lipofilowymi) z uwagi na ułatwienie transportu substancji powodujących degradację do wnętrza nanowłókien. Przyspieszona degradacja może mieć pośrednio wpływ na szybkość uwalniania leku.

Podczas elektroprzędzenia emulsji wykorzystując pojedynczą dyszę, przy zachowaniu odpowiednich warunków elektroprzędzenia możliwe jest uzyskanie struktury nanowłókna przypominającej strukturę typu rdzeń w osnowie. Rdzeń nanowłókna w tego typu strukturze nie ma struktury ciągłej zaś przybiera formę blisko sąsiadujących kropli fazy wodnej (Rys. 4.28.). Możliwe jest w tym przypadku osiągnięcie wydłużonego w czasie uwalniania substancji aktywnej. Dla jednego z polimerów – PLC, wykonano włókna techniką rdzeń w osnowie wykorzystując układ dwudyszowy (Rys. 4.33.). Aby zwiększyć lepkość rdzenia i zapewnić prawidłowe elektroprzędzenie oraz formowanie się struktury rdzeń – osnowa, do roztworu rdzenia dodano polimeru PEO uzyskując zawartość 4% wag. polimeru w rdzeniu. Zastosowanie techniki rdzeń – osnowa pozwoliło na uniknięcie stosowania surfaktantu w nanowłóknach, który może mieć cytotoksyczne działanie na komórki tkanki nerwowej.

Badania goniometryczne nanowłókien zawierających fazę wodną, wykazały dużą zwilżalność materiału z natychmiastową absorpcją wody przez materiał. W przypadku materiału z otoczką polimeru PLC wykonanego techniką rdzeń w osnowie, otrzymany wynik zwilżalności był podobny jak w przypadku materiałów zawierających Rodaminę B (Tab. 4.1.) i wyniósł $121 \pm 10^\circ$.



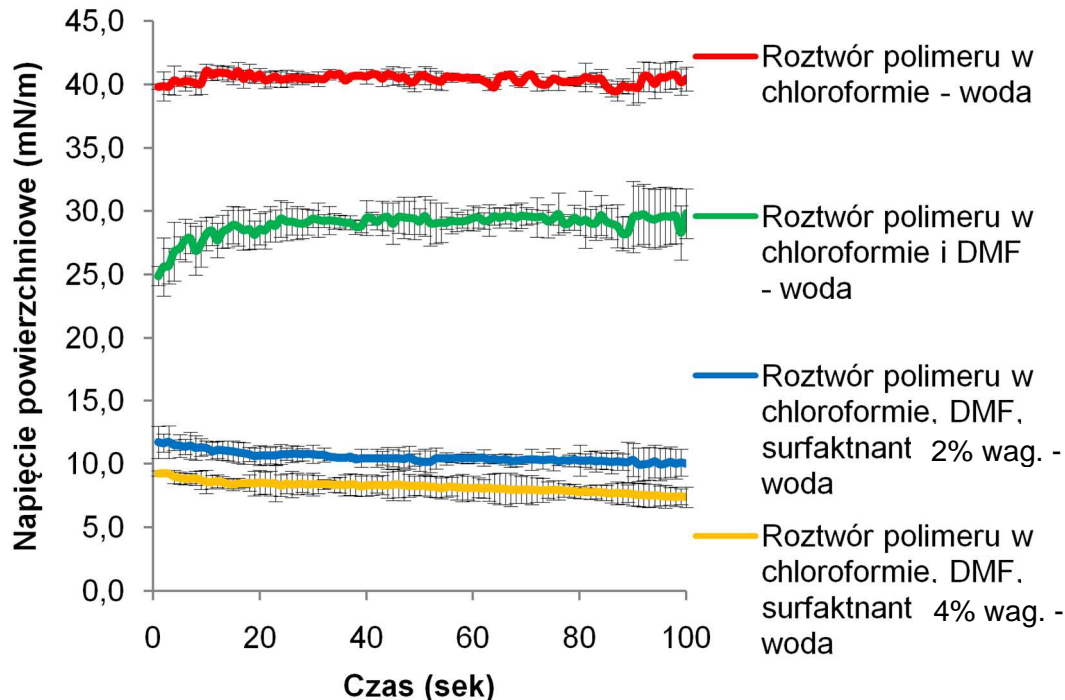
Rys. 4.28. Nanowłókna powstałe z elektroprzędzenia emulsji. Zdjęcie wykonano na mikroskopie fluorescencyjnym, barwnik – fluoresceina.

Parametry elektroprzędzenia były takie same dla każdego ze standardowych materiałów elektroprzędzonych z emulsji. Natężenie objętościowe przepływu roztworu polimeru przez dyszę wynosiło $Q = 800 \mu\text{l/h}$. W przypadku elektroprzędzenia w układzie typu rdzeń w osnowie natężenie objętościowe roztworu rdzenia wynosiło $Q_1 = 500 \mu\text{l/h}$ zaś roztworu osnowy $Q_2 = 1500 \mu\text{l/h}$. Różnica potencjałów pomiędzy dyszą a kolektorem w każdym z przypadków wynosiła 1 kV/cm zaś odległość 15 cm . W zależności od warunków, nieznacznie modyfikowano te parametry aby uzyskać lepszą stabilność elektroprzędzenia. Uwalnianie prowadzono w temperaturze 37°C , do roztworu buforu fosforanowego PBS symulującego środowisko komórkowe.

Badania wpływu składu roztworu polimeru na napięcie powierzchniowe pomiędzy fazą wodną i olejową

Przeprowadzono szereg badań nad wpływem składu roztworów używanych w elektroprzędzeniu emulsji oraz w układzie typu rdzeń osnowa, na dynamikę napięcia powierzchniowego pomiędzy fazami (Rys. 4.29). W każdym z przypadków wykonano roztwory polimerów PLC o stężeniu 9% wag. względem polimeru. Badania kalibracyjne wykonano dla układu powietrze – woda, dla którego napięcie powierzchniowe wg danych literaturowych wynosi 72 mN/m . W wykonanym na potrzeby niniejszej pracy układzie eksperymentalnym, otrzymany wynik napięcia powierzchniowego wynosił $67 \pm 4 \text{ mN/m}$. Dalsze badania prowadzono w układzie dwóch faz ciekłych: roztwór polimeru – woda. Napięcie powierzchniowe w układzie roztwór polimeru PLC 9% wag. w chloroformie – woda wykazało brak znaczących zmian wartości napięcia powierzchniowego w czasie. Dodatek rozpuszczalnika DMF do roztworu polimeru, w stosunku 1:9 (DMF:chloroform)

spowodował nieznaczny wzrost napięcia powierzchniowego z 25 do 28 mN/m przez pierwsze 30 sekund eksperymentu. Rozpuszczalnik DMF miesza się z wodą, stąd też po rozpoczęciu pomiaru mógł on przechodzić z fazy organicznej do wodnej powodując spadek objętości kropli. Dodatek surfaktantu (2% wag. SPAN-80) do fazy organicznej spowodował znaczny spadek napięcia powierzchniowego pomiędzy dwiema fazami. Zaobserwowano zmianę napięcia międzyfazowego w czasie od wartości około 13 do 10 mN/m. Dwukrotny wzrost zawartości surfaktantu w roztworze polimeru (4% wag. SPAN-80) spowodował nieznaczny spadek początkowego napięcia powierzchniowego do 9 mN/m i taką samą dynamikę zmiany napięcia międzyfazowego w czasie jak w przypadku zawartości 2 % wag. surfaktantu w roztworze polimeru. Znajomość wartości parametru napięcia powierzchniowego jest bardzo ważna z punktu widzenia tworzonych włókien typu rdzeń w osnowie jak również procesu emulsyfikacji. Dla jak najlepszego rozdrobnienia kropli fazy wodnej w fazie olejowej można stosować różne surfaktanty (SPAN-80, Triton-X, SDS, lecytyna sojowa), pozwalające zachować stabilność emulsji dzięki zahamowaniu koalescencji kropli fazy rozproszonej. Na potrzeby niniejszej pracy postanowiono wykorzystać najczęściej stosowany w literaturze surfaktant SPAN-80.



Rys. 4.29. Wpływ składu roztworów na dynamikę napięcia powierzchniowego.

Badania wpływu składu roztworu na proces tworzenia emulsji

W tabeli 4.3 przedstawiono wyniki analizy wielkości kropeł fazy wodnej dla różnych ilości poszczególnych składników. W każdym z przypadków, procedura wytwarzania emulsji była jednakowa. Zaobserwowano wzrost średnicy kropeł w przypadku większej zawartości fazy wodnej w roztworze polimeru PLC o stężeniu 9% wag. dla dwóch zawartości surfaktantu 2% wag. oraz 4% wag. Dodatkowo, zauważono spadek średnicy kropeł wraz ze spadkiem zawartości użytego surfaktantu w roztworze polimeru PLC (9% wag.). Parametry elektroprzewodzonych materiałów przedstawiono w tabeli 4.4.

Tab.4.3. Wyniki pomiaru średnicy kropeł emulsji w roztworze polimeru PLC 9% wag. z fazą wodną.

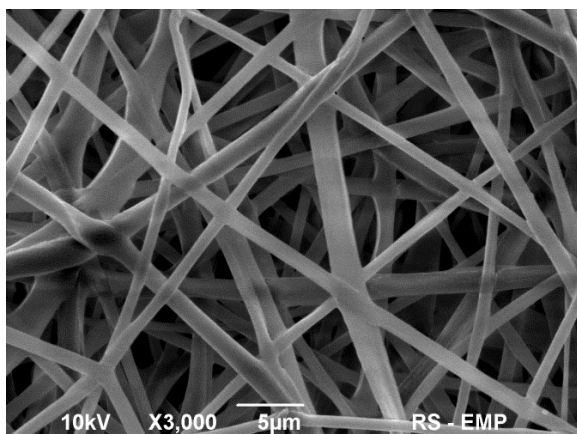
Zawartość surfaktantu wzgl. polimeru (% wag.)	Zawartość fazy wodnej wzgl. polimeru (% wag.)	Średnica kropeł (μm)	Odchylenie standardowe (μm)
4	2,5	3,9	1,3
4	1,25	2,4	1,1
2	5	5,2	1,4
2	2,5	2,5	0,7

Analiza mikroskopowa nanowłókien z białkiem BSA-FITC

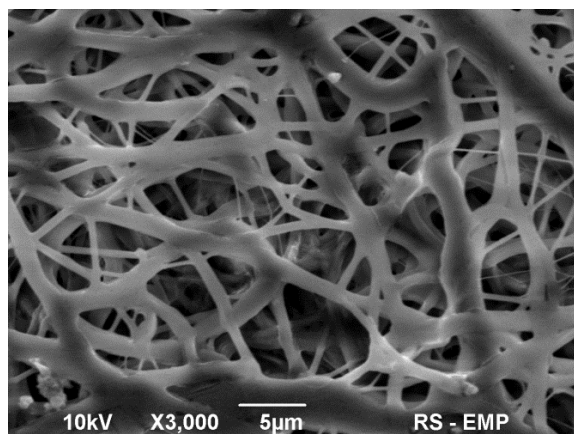
Obrazy mikroskopii elektronowej (Rys. 4.30. – 4.35.) wskazują na poprawną budowę materiału z polimeru PDLG i PLLA oraz sklejenie włókien PLC. W szczególności materiał z polimeru PLC charakteryzował się odmienną morfologią włókien. Wzrost zawartości fazy wodnej w emulsji (Rys. 4.34.) spowodował prawdopodobnie utrudnienia w odparowaniu rozpuszczalnika z włókien. Największe posklejanie włókien otrzymano dla mniejszej ilości surfaktantu (Rys. 4.35.). Podobne wyniki morfologii posklejanych włókien otrzymano w pracach innych grup badawczych [148].

Tab.4.4. Parametry badanych materiałów zawierających białko BSA-FITC.

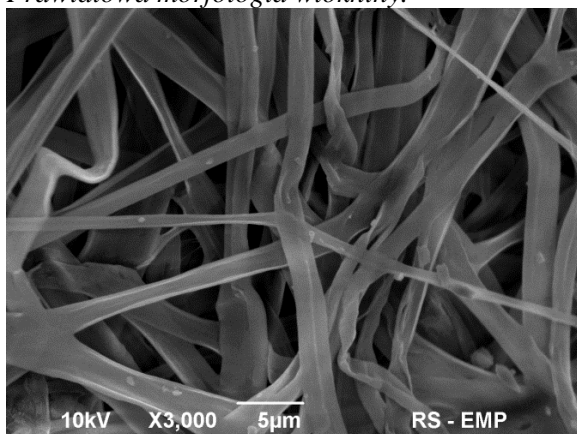
Nr materiału	Polimer	Zawartość BSA-FITC wzgl. polimeru (% wag.)	Dodatkowe cechy	Zawartość surfaktantu wzgl. polimeru (% wag.)	Zawartość fazy wodnej wzgl. polimeru (% wag.)	Grubość nanowłókien (μm)	Porowatość materiału (-)
MBF1	PDLG	1,7	Standardowy materiał elektroprz. z emulsji	4	2,5	$1,08 \pm 0,35$	0,70
MBF2	PLC	1,5	Standardowy materiał elekt. z emulsji	4	2,5	$0,80 \pm 0,50$	0,60
MBF3	PLLA	1,8	Standardowy materiał elektroprz. z emulsji	4	2,5	$1,47 \pm 0,70$	0,45
MBF4	PLC	1,0	Rdzeń w osnowie	brak	10	$1,26 \pm 0,80$	0,40
MBF5	PLC	0,7	Standardowy materiał elektroprz. z emulsji	2	2,5	$1,37 \pm 0,35$	0,30
MBF6	PLC	0,8	Standardowy materiał elektroprz. z emulsji	2	5	$1,04 \pm 0,65$	0,25



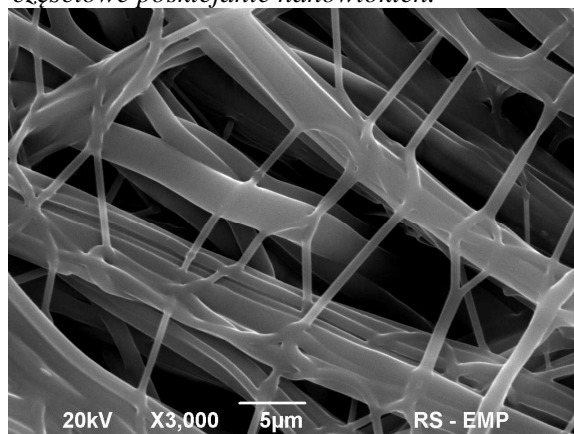
Rys. 4.30. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MBF1). Prawidłowa morfologia włókniny.



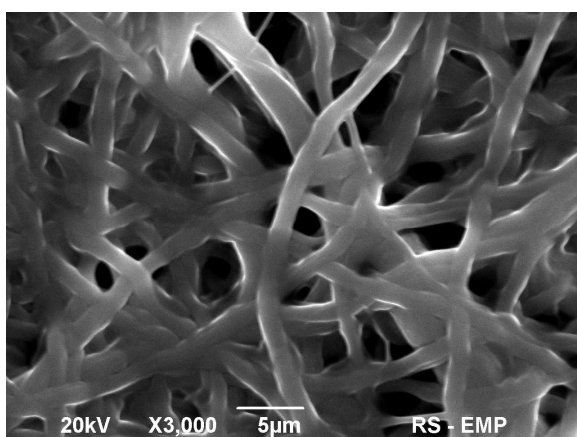
Rys. 4.31. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MBF2). Widoczne częściowe posklejanie nanowłókien.



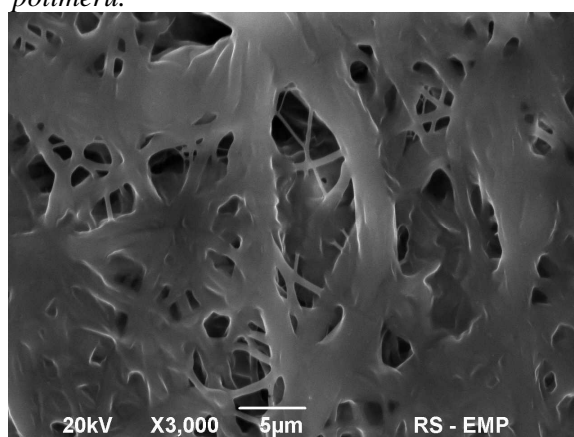
Rys. 4.32. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLLA (MBF3). Prawidłowa morfologia włókniny.



Rys. 4.33. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC elektroprzędzonych techniką rdzeń w osnowie (MBF4). Widoczna duża ilość cienkich włókien, powstałych w wyniku wtórnego elektroprzędzenia ze strugi polimeru.



Rys. 4.34. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC o zawartości 2,5% fazy wodnej wzgl. polimeru (MBF5). Widoczne częściowe posklejanie nanowłókien.

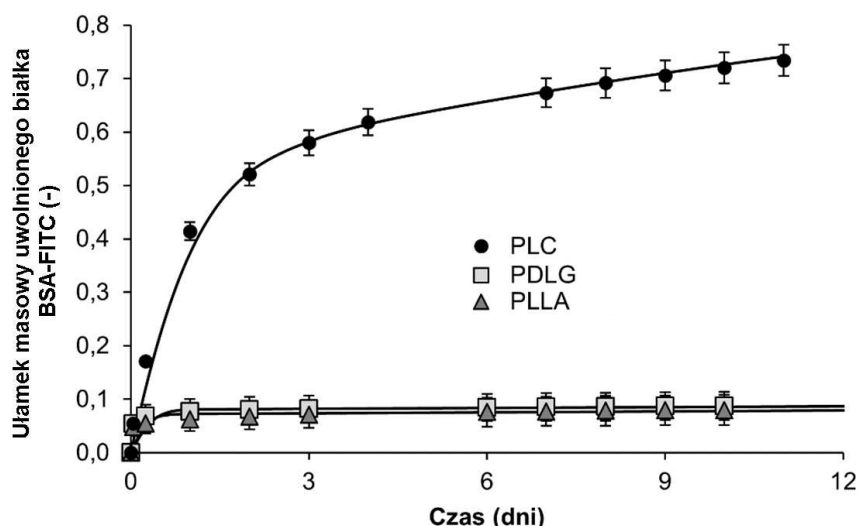


Rys. 4.35. Obraz mikroskopii SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC o zawartości 5% fazy wodnej wzgl. polimeru (MBF6). Widoczne bardzo duże posklejanie nanowłókien.

Wyniki uwalniania białka BSA-FITC

Przebieg uwalniania białka BSA-FITC z materiałów przedstawionych w tabeli 4.3. pokazano na rysunkach 4.36 – 4.39. Wykresy przedstawiają kumulatywnie uwolnioną masę analogu, odniesioną do całkowitej masy białka obecnego w materiale.

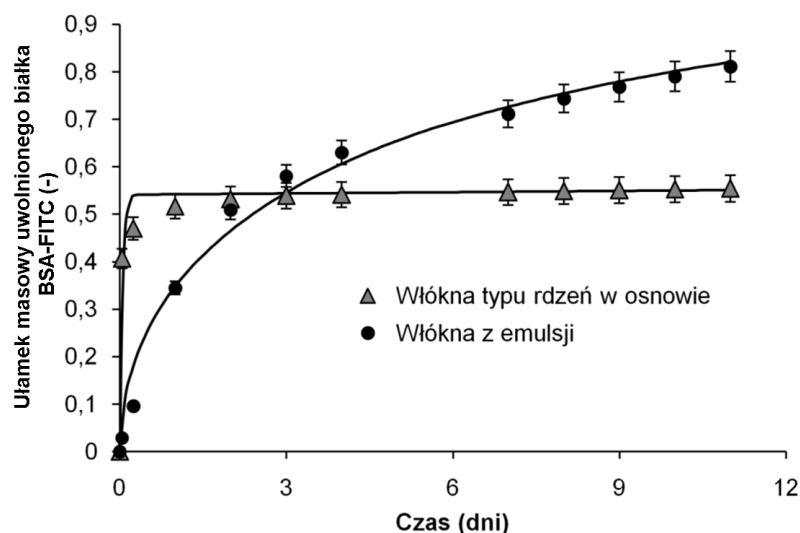
W pierwszej kolejności wykonano badania uwalniania białka BSA-FITC z nanowłókien polimerów: PLC, PDLG i PLLA. Podobnie jak w przypadku uwalniania Rodaminy B z nanowłókien elektroprzędzonych techniką standardową, najwyższym stopniem uwolnienia cechują się włókna PLC (Rys. 4.36). Przez pierwsze 3 dni eksperymentu, materiał ten uwalniał białko z największą szybkością, po czym w następnych dniach zaobserwowano stopniowe spowolnienie uwalniania, w rezultacie osiągając 70% uwolnionego białka po 11 dniach. Materiały z PDLG i PLLA cechowały się szybkim wzrostem uwalniania do poziomów odpowiednio 9% i 7%. W dalszym etapie uwalniania zaobserwowano bardzo powolny wzrost ilości uwolnionego białka.



Rys. 4.36. Profil uwalniania białka BSA-FITC z trzech materiałów sporządzonych z polimerów: PLC (MBF6), PDLG (MBF1) oraz PLLA (MBF3). Linia ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

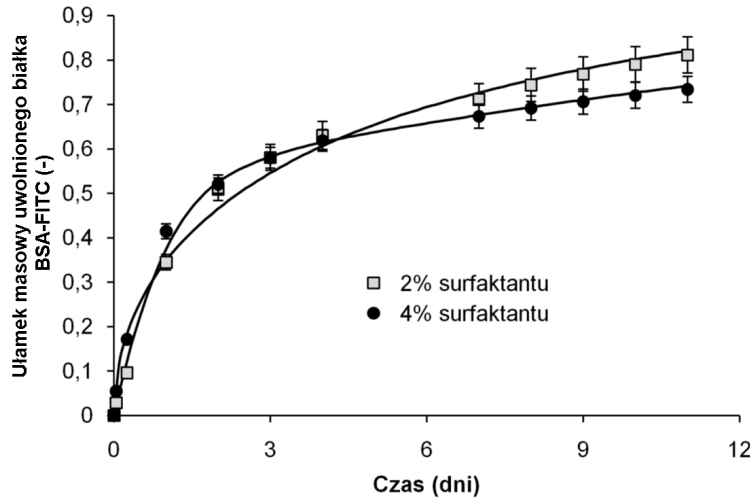
Dla materiału typu rdzeń-osnowa (MBF4) widoczny jest początkowy wyrzut leku (Rys. 4.37). Spowodowane jest to najprawdopodobniej częściowym pękaniem nanowłókien z których wypływa roztwór leku. Zauważalne jest to podczas obserwacji pod mikroskopem fluorescencyjnym nanowłókien naniesionych na szkiełka nakrywkowe. Dalszy wzrost uwolnionej masy z nanowłókna z rdzeniem jest hamowany przez membranę osłaniającą rdzeń, co jest typowe w tego typu układach. Uwalnianie białka z włókien sporządzonych metodą emulsyjną (MBF2, MBF5), cechuje się odmiennym przebiegiem procesu. Brak jest

zauważalnego wyrzutu leku, zaś sam przebieg eksperymentu przypomina obserwowany wcześniej profil uwalniania alfa-tokoferolu. Materiał ten w ciągu 12 dni uwolnił niemal całkowitą dawkę substancji zawartą w nanowłóknach, co może wskazywać na dużą koncentrację kropeł emulsji przy powierzchni nanowłókien.



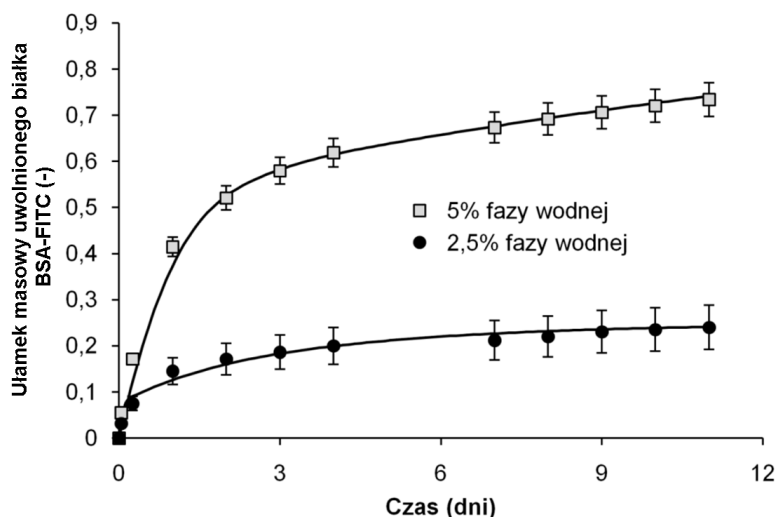
Rys. 4.37. Profil uwalniania białka BSA-FITC z materiałów PLC o strukturze włókien monolitycznych (MBF5) oraz włókien typu rdzeń w osnowie (MBF4). Widoczne stopniowe uwalnianie białka z włókien wykonanych standardową techniką elektroprzędzenia emulsji oraz skokowe uwolnienie białka z włókien typu rdzeń w osnowie. Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Porównano również wpływ obecności surfaktantu w emulsji na proces uwalniania białka (Rys. 4.38). Zmniejszenie o połowę ilości użytego surfaktantu od 4% wag. (MBF2) do 2% wag. (MBF5) surfaktantu spowodowało niewielki wzrost uwalniania BSA-FITC od 7 dnia eksperymentu. Może być to związane z rozbięciem kropeł na mniejsze średnice, a przez to szybszym transportem leku z kropeł do ośrodka odbierającego składnik.



Rys. 4.38. Profil uwalniania białka BSA-FITC z materiałów PLC elektroprzędzonych z emulsji dla różnych zawartości surfaktantu w materiale: 4% (MBF2) oraz 2% (MBF5). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Porównanie materiałów o różnej zawartości fazy wodnej względem masy polimeru wskazuje na blisko trzykrotne zwiększenie uwolnionej masy po 11 dniach eksperymentu dla materiału o 5% wag. zawartości fazy rozproszonej (MBF6). Materiał ten przez 3 pierwsze dni uwolnił około 60% początkowej masy substancji, osiągając po kolejnych 9 dniach stałego uwalniania 75% masy BSA-FITC. Materiał z 2,5% zawartością fazy wodnej (MBF5) z uwagi na mniejszą ilość BSA-FITC w całym materiale charakteryzował się mniejszą szybkością uwalniania. W obu przypadkach nie zaobserwowano negatywnego zjawiska początkowego wyrzutu ilości dawki substancji (Rys. 4.40).



Rys. 4.39. Profil uwalniania BSA-FITC z materiałów PLC elektroprzędzonych z emulsji dla różnych zawartości fazy wodnej w materiale: 5% (MBF6) oraz 2% (MBF5). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

4.1.2.2. Leki hydrofilowe – czynniki wzrostu NGF i BDNF

Po przeprowadzonej serii eksperymentów uwalniania białka BSA-FITC z polimerów PLC, PDLG oraz PLLA do dalszych badań z czynnikami wzrostu wybrano polimer PLC charakteryzujący się największym stopniem uwolnienia białka BSA-FITC (Rys. 4.36).

Obok badań materiałów wykonanych z użyciem emulsji wyprzędzono dwa materiały z NGF wytworzone techniką rdzeń – osnowa (Rys. 4.40). W pierwszym z materiałów do sporządzenia roztworu rdzenia wykorzystano polimer PEO 4% wag. względem wody w 0,01M buforze PBS z odpowiednią ilością białka NGF. Dodatek PEO miał za zadanie zwiększyć lepkość roztworu i jednocześnie poprawić prędkość rdzenia. Do drugiego materiału dodano polimer PEO (4% wag.) oraz glicerynę jako czynnik osłaniający białko oraz dodatkowo zwiększający lepkość roztworu rdzenia. Roztwór polimeru PLC 9% wag. został użyty do utworzenia osnowy (powłoki) nanowłókna.

Parametry elektroprzędzenia były takie same dla każdego ze standardowych materiałów elektroprzędzonych z emulsji. Natężenie objętościowe przepływu roztworu polimeru przez dyszę wynosiło $Q = 800 \mu\text{l/h}$. W przypadku elektroprzędzenia w układzie typu rdzeń w osnowie natężenie objętościowe roztworu rdzenia wynosiło $Q_1 = 500 \mu\text{l/h}$ zaś roztworu osnowy $Q_2 = 2000 \mu\text{l/h}$. Różnica potencjałów pomiędzy dyszą a kolektorem w każdym z przypadków wynosiła 1 kV/cm zaś odległość 15 cm . W zależności od warunków, nieznacznie zmieniano te parametry aby uzyskać lepszą stabilność elektroprzędzenia. Uwalnianie prowadzono w temperaturze 37°C , do roztworu buforu fosforanowego PBS symulującego środowisko komórkowe.

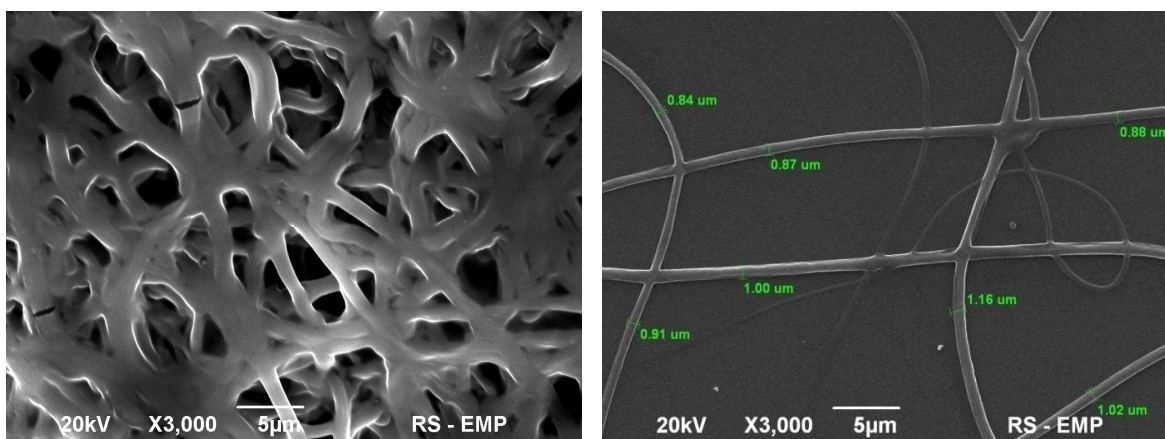
Dane dotyczące badanych materiałów umieszczono w Tab. 4.5.

Tab. 4.5. Parametry badanych materiałów zawierających czynniki wzrostu NGF i BDNF. Wszystkie materiały wykonano z polimeru PLC.

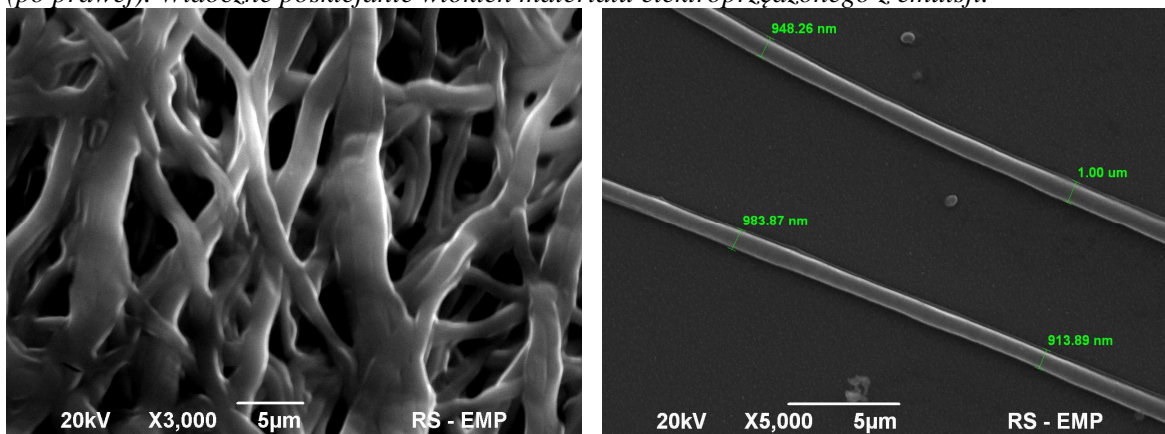
Nr materiału	Metoda elektroprzędzenia	Lek	Stężenie leku (% wag.) ($\cdot 10^{-4}$)	Zawartość surfaktantu wzgl. polimeru (% wag.)	Zawartość fazy wodnej wzgl. polimeru (% wag.)	Zawartość gliceryny w rdzeniu wzgl. roztw. rdzenia (% wag.)	Porowatość materiału (-)	Grubość nanowłókien (μm)
MN1	Z emulsji	NGF	1	4	4,7	brak	0,40	$0,97 \pm 0,15$
MN2	Z emulsji	NGF	0,5	4	2,5	brak	0,40	$1,02 \pm 0,10$
MN3	Z emulsji	NGF	3	4	13	brak	0,35	$0,68 \pm 0,15$
MN4	Z emulsji	NGF	1	2	4,7	brak	0,30	$0,86 \pm 0,20$
MN5	Z emulsji	NGF	1	4	6,0	brak	0,30	$2,34 \pm 0,85$
MN6	Rdzeń w osnowie	NGF	1	brak	10	25	0,60	$2,15 \pm 1,40$
MN7	Rdzeń w osnowie	NGF	1	brak	10	brak	0,55	$1,22 \pm 0,40$
MB1	Z emulsji	BDNF	1	2	5	brak	0,45	$1,28 \pm 0,40$
MB2	Z emulsji	BDNF	1	4	5	brak	0,35	$1,57 \pm 0,65$
MB3	Z emulsji	BDNF	1,5	2	7	brak	0,30	$1,33 \pm 0,20$

Analiza mikroskopowa nanowłókien z czynnikami wzrostu NGF i BDNF

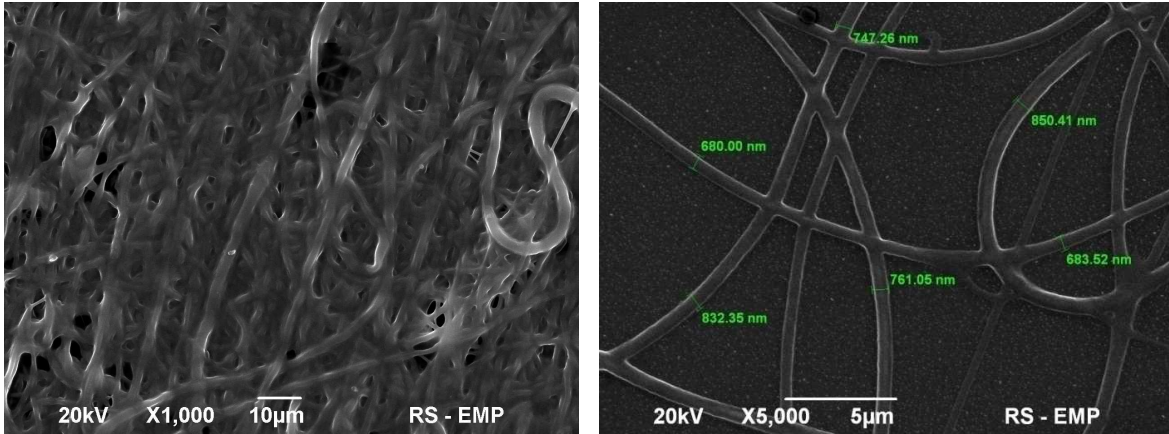
Na rysunkach 4.40 – 4.49 przedstawiono zdjęcia SEM materiałów i włókien zbieranych na szkiełka mikroskopowe. W przypadku materiałów elektroprzędzonych z emulsji, widoczne jest zespolenie włókien spowodowane niecałkowitym odparowaniem rozpuszczalnika organicznego podczas elektroprzędzenia, zaś późniejszym odparowaniem z zebranego na kolektorze materiału. W porównaniu do metody elektroprzędzenia z emulsji, włókna typu rdzeń – osnowa zachowały typową morfologię włókniny. W celu przedstawienia rozkładu grubości włókien, podczas elektroprzędzenia zbierano włókna na szkiełka mikroskopowe w odległości od dyszy zbliżonej do odległości kolektora tak aby otrzymać reprezentatywną próbkę.



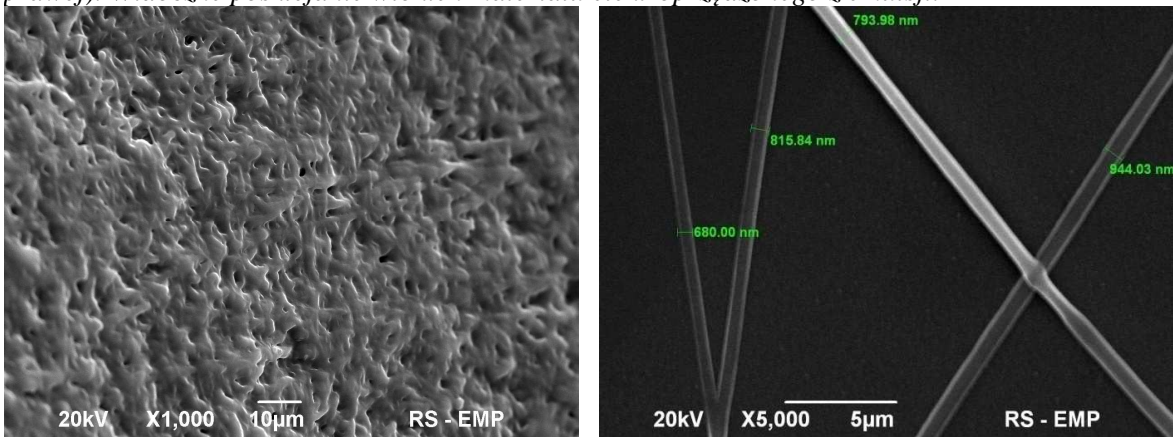
Rys. 4.40. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 4,7% fazy wodnej (materiał MNI) (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji.



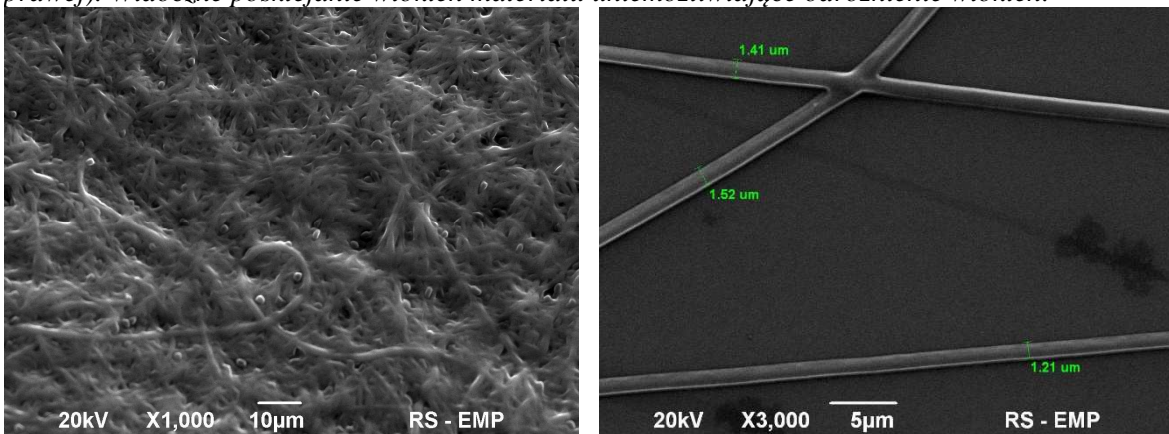
Rys. 4.41. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 2,5% fazy wodnej MN2 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji.



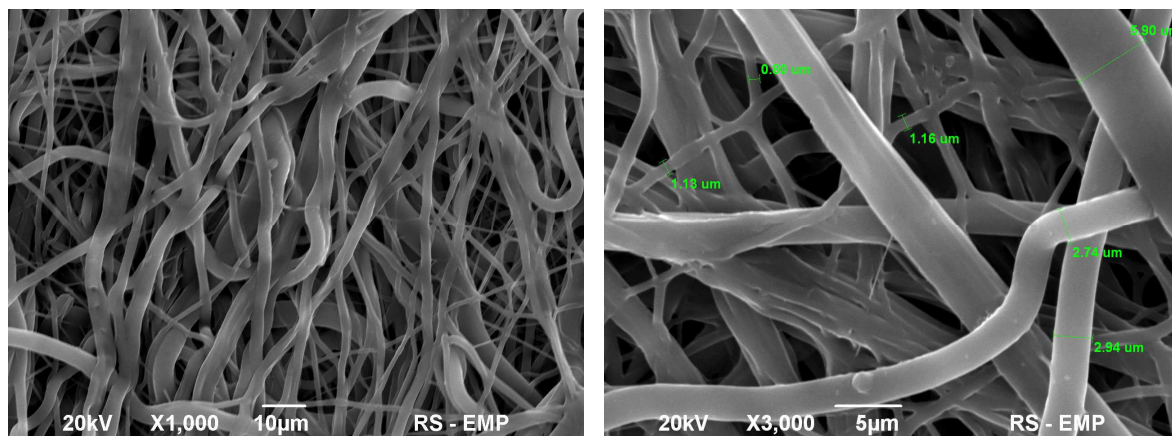
Rys. 4.42. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 13% fazy wodnej MN3 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji.



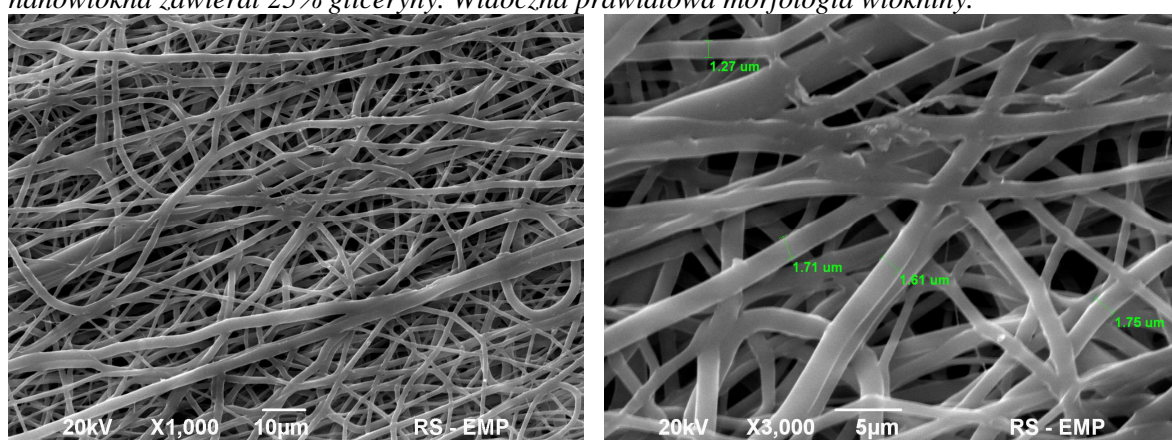
Rys. 4.43. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 4,7% fazy wodnej MN4 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału uniemożliwiające odróżnienie włókien.



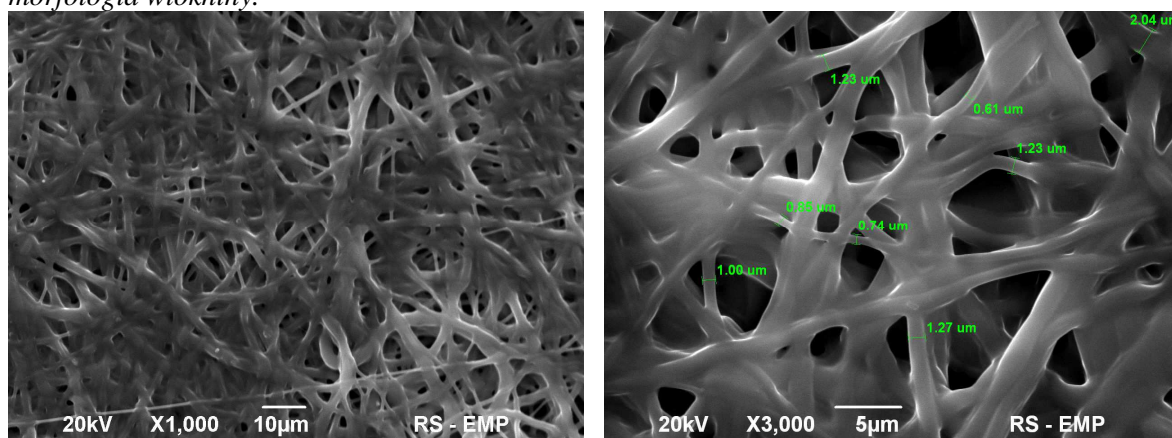
Rys. 4.44. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających czynnik wzrostu NGF w 6% fazy wodnej MN5 (po lewej) oraz pojedynczych włókien ze szkiełka mikroskopowego (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału uniemożliwiające odróżnienie włókien.



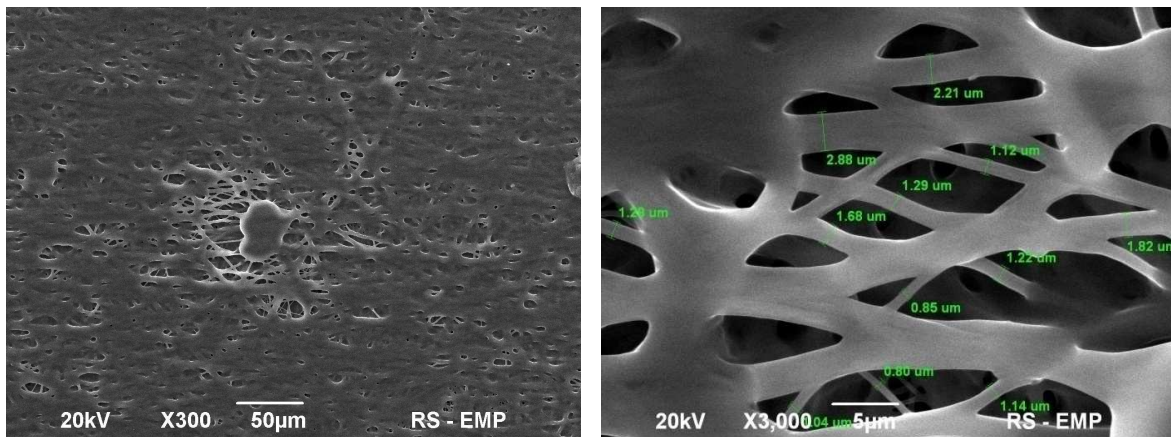
Rys. 4.45. Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC elektroprzędzonego techniką rdzeń - osnowa MN6 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Materiał w rdzeniu nanowłókna zawierał 25% gliceryny. Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.



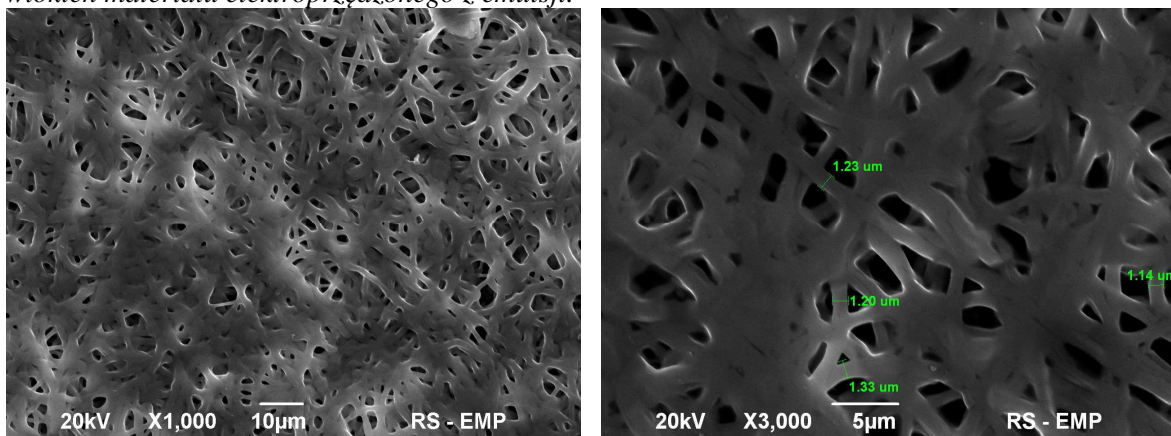
Rys. 4.46. Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC elektroprzędzonego techniką rdzeń - osnowa MN7 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Widoczna prawidłowa morfologia włókniny.



Rys. 4.47. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających białko BDNF w 5% fazy wodnej MBI (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji.



Rys. 4.48. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających białko BDNF w 5% fazy wodnej MB2 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji.

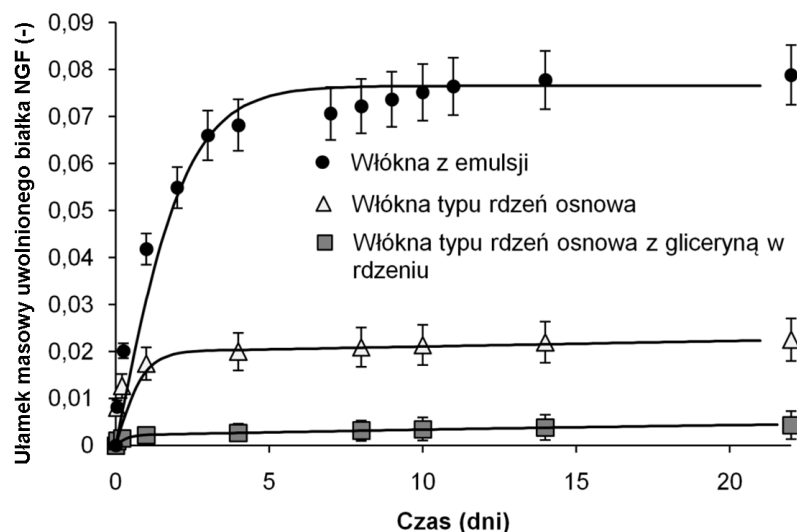


Rys. 4.49. Obrazy SEM powierzchni włókien polimeru PLC zawierających białko BDNF w 7% fazy wodnej MB3 (po lewej) ze zbliżeniem na poszczególne włókna (po prawej). Widoczne posklejanie włókien materiału elektroprzędzonego z emulsji.

Wyniki uwalniania czynników wzrostu NGF i BDNF

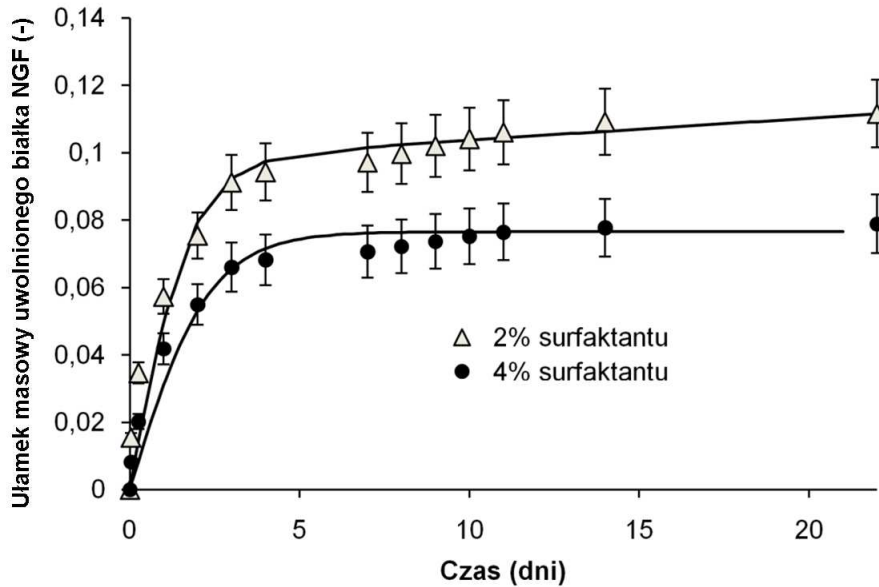
Na poniższych wykresach (Rys. 4.50 – 4.54) przedstawiono profile uwalniania białek NGF i BDNF otrzymane metodą opisaną w rozdziale 2.5.2. Pierwsze porównanie sporządzono dla materiałów wykonanych różną techniką elektroprzędzenia (rdzeń-osnowa, elektroprzędzenie roztworu emulsji). Charakterystyka uwalniania NGF z nanowłókien wytworzonych techniką przedzenia emulsji jest taka sama jak w przypadku analogu BSA-FITC (porównaj 4.50 i 4.37). W przeciągu pierwszych 3-4 dni następuje szybsze uwolnienie ilości białka bez wyrzutu leku. W następnych dniach zaobserwowano stopniowy wzrost uwolnionej substancji. Przewidywania modelu mikroskopowego (podstawowego) wskazują na hamowanie uwalniania przy poziomie 8%. Podobną charakterystykę uwalniania czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego zaobserwowano w pracach Tian i in. [56]. Uwolnienie białka z włókien typu rdzeń – osnowa (MN5) miało podobny przebieg jak w przypadku analogu leku (porównaj 4.50 i 4.37). Zaobserwowano nieznaczny wzrost ilości substancji

uwolnionej do ośrodka odbierającego lek i dalszy powolny wzrost ilości uwolnionego czynnika wzrostu. Dodanie gliceryny do roztworu rdzenia (MN6) (wodny roztwór PBS zawierający 4% wag. PEO) spowodowało obniżenie ilości uwolnionego białka NGF.

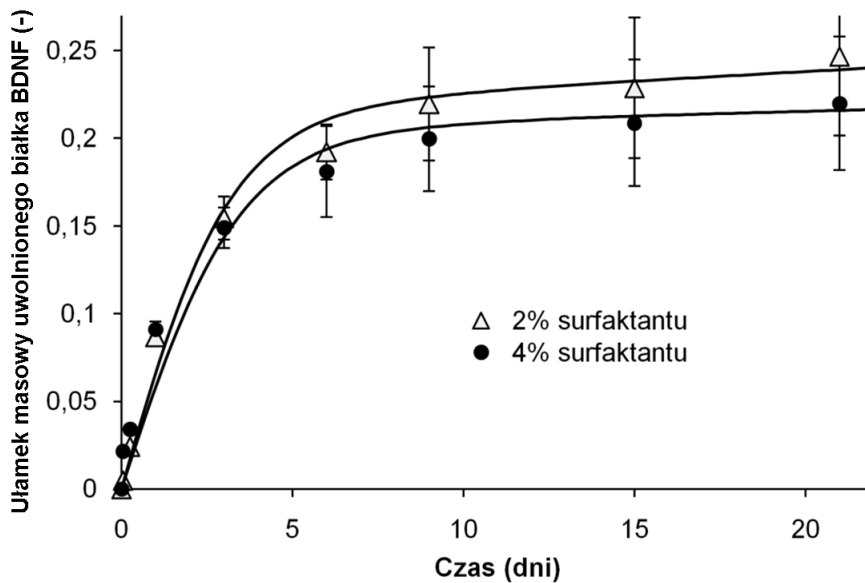


Rys. 4.50. Profile uwalniania białka NGF z materiałów elektroprzędzonych różnymi metodami (włókna z emulsji i rdzeń - osnowa) jak również z dodatkiem gliceryny w rdzeniu włókna (porównanie materiałów MN1, MN5, MN6). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

W przypadku białka NGF, podobnie jak dla analogu BSA-FITC, spadek zawartości surfaktantu skutkował wzrostem ilości uwolnionego czynnika wzrostu (por. 4.38 i 4.51). Średni rozmiar nanowłókien z mniejszą zawartością surfaktantu (MN4) był około 100 nm mniejszy, co również mogło mieć wpływ na zwiększony strumień uwalnianego czynnika wzrostu (4.51). Różnica uwalniania czynnika BDNF nie była już tak wyraźna, dając wynik niejednoznaczny (Rys. 4.52). Jednocześnie dla BDNF zaobserwowano dwukrotnie większy stopień uwolnienia po 21 dniach w porównaniu do NGF. Wielkość cząsteczek obu czynników jest jednakowa.



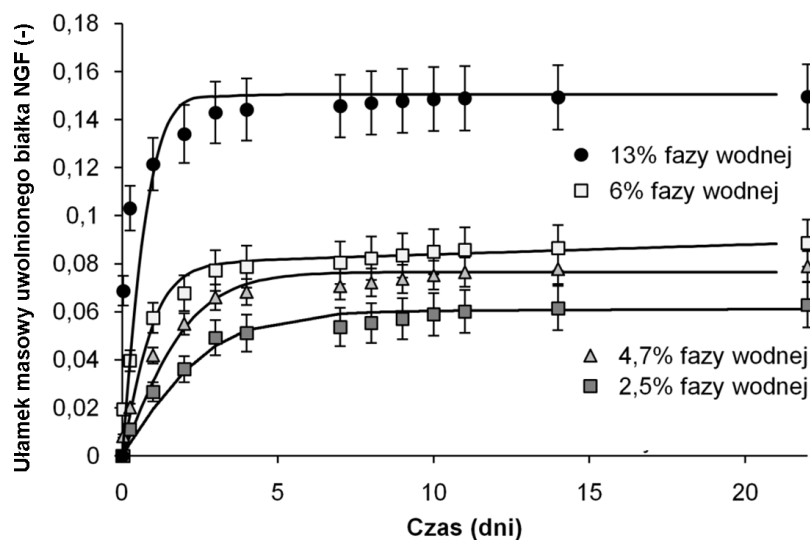
Rys. 4.51. Profile uwalniania białka NGF z materiałów o różnej zawartości surfaktantu: 2% wag. (MN4) i 4% wag. (MN1). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.



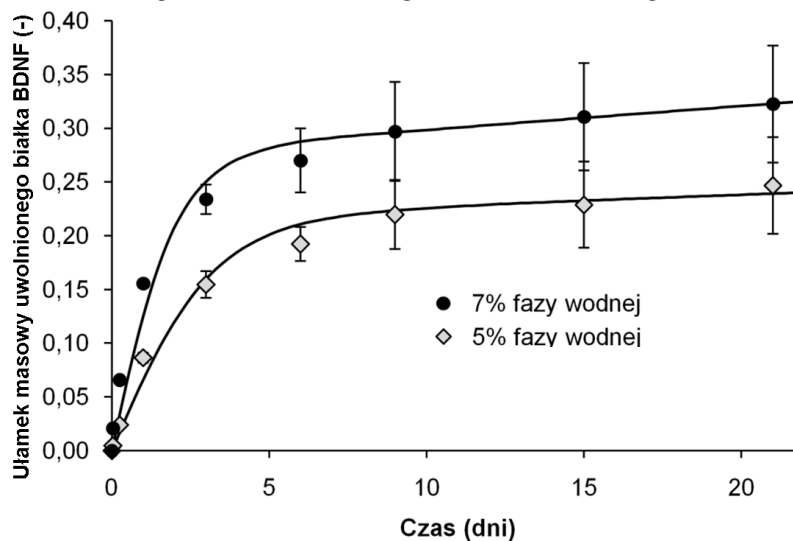
Rys. 4.52. Profile uwalniania białka BDNF z materiałów o różnej zawartości surfaktantu 2% wag. (MB1) i 4% wag. (MB2). Linią ciągłą przedstawiono wyniki obliczeń numerycznych modelu mikroskopowego (podstawowego) dopasowujących profil uwalniania do danych eksperymentalnych.

Większy udział fazy wodnej (stężenie białka w roztworze w każdym przypadku było takie samo) w materiale skutkowało zwiększeniem ilości uwolnionych czynników wzrostu (Rys. 4.53). Przyczyną jest najprawdopodobniej obecność większej ilości fazy rozproszonej przy powierzchni włókna i ułatwiony transport białka z kropli poza włókno. Zbyt duża zawartość fazy wodnej może prowadzić do niekorzystnego początkowego wyrzutu

substancji czynnej. W przypadku białka BDNF również można zauważyć większą ilość uwolnionego białka dla materiału o większej zawartości fazy wodnej (Rys. 4.54).



Rys. 4.53. Profile uwalniania białka NGF z materiałów o różnej zawartości fazy wodnej: 13% wag. (MN3), 6% wag. (MN5), 4,7% wag. (MN1), 2,5% wag. (MN2).



Rys. 4.54. Profile uwalniania białka BDNF z materiałów o różnej zawartości fazy wodnej: 7% wag. (MB3), 5% wag. (MB1).

Wnioski

Otrzymane wyniki badań uwalniania czynników wzrostu podobnie jak w poprzednim przypadku skonsultowano ze współpracownikami z IMDiK (prof. M Frontczak-Baniewicz, dr D. Sulejczak). Stwierdzono, iż z uwagi na niewielką różnicę pomiędzy profilami uwalniania z materiałów przygotowywanych z 2% wag. i 4% wag. zawartością surfaktantu w materiałach z NGF i BDNF na modelu zwierzęcym należy zastosować materiały z 2% wag. zawartością SPAN-80. Uwolnienie około 8% (NGF, materiał MN1) i 23% (BDNF, materiał MB1) dawki leku zawartego w materiale przez okres

21 dni i stopniowe wyhamowanie uwalniania zapewnią stałe dostarczanie czynników wzrostu do uszkodzonej tkanki przez wiele miesięcy od implantacji materiału.

4.2. Uwalnianie analogów leku do hydrożelu PVA

Kontrolowane, długotrwałe podawanie leków do mózgu po operacjach neurochirurgicznych, ma olbrzymie znaczenie w terapii przeciwrakowej oraz chorobach neurodegeneracyjnych (Parkinsona, Alzheimer). Zmiana składu nanowłókien oraz ich ułożenia w materiale pozwala na modyfikację szybkości uwalniania leków. Dobranie odpowiedniej porowatości materiału oraz morfologii włókien wpływa na dyfuzję leku, a zatem daje możliwość kontroli profilu uwalniania leków z materiału [125], [149].

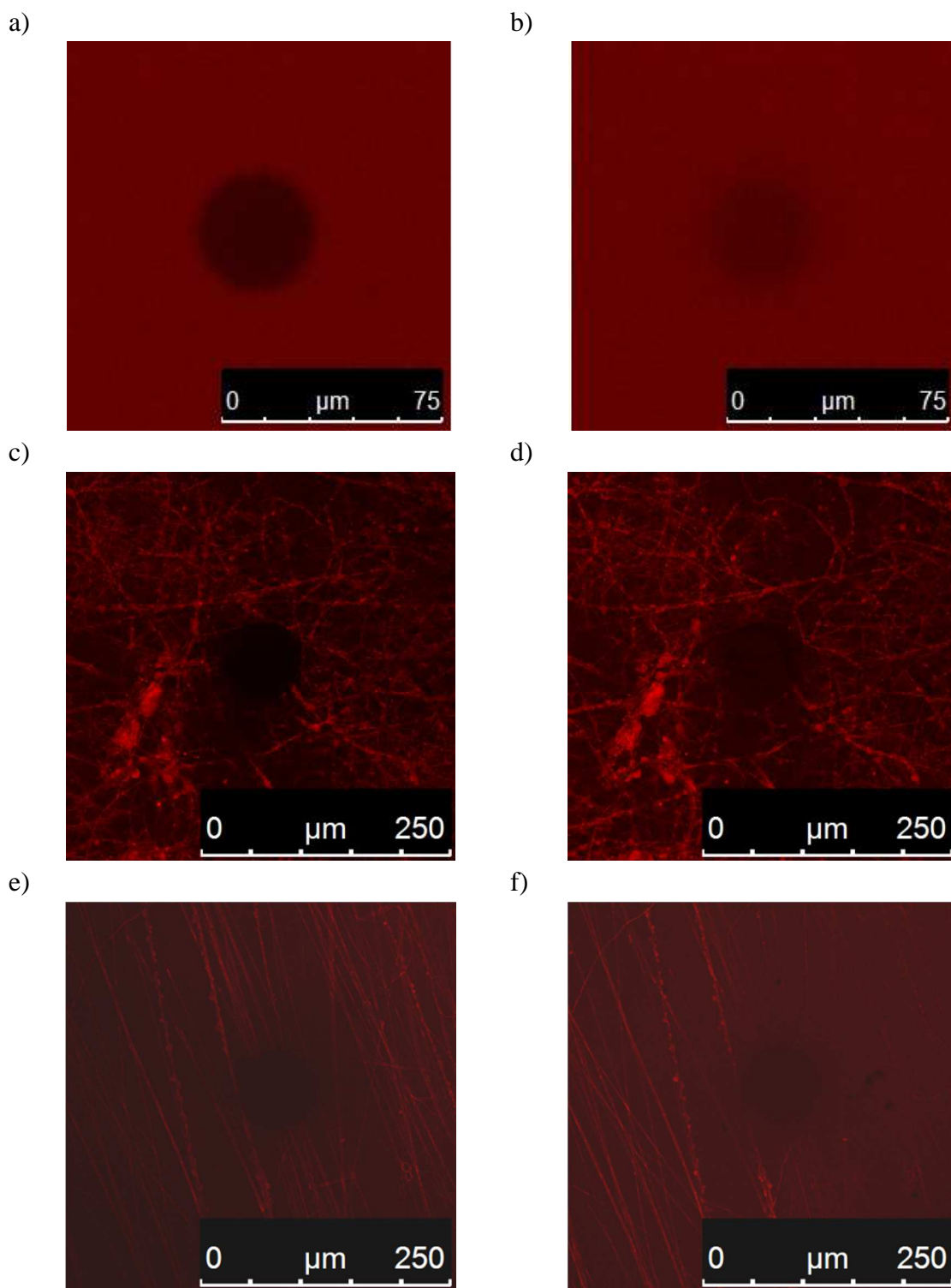
W niniejszej części pracy przedstawiono wyniki eksperymentalne i numeryczne (model makroskopowy, podstawowy) uwalniania w żelu dwóch substancji modelowych: Rodaminy B i BSA-FITC. Badania miały na celu ocenę wykonanych materiałów z nanowłókien w ośrodku imitującym własności dyfuzyjne tkanki mózgowej. Wybrany ośrodek składający się z hydrożelu poli(alkoholu winylowego) usieciowanego boraksem, umożliwił uniknięcie rozpraszania światła na łańcuchach polimeru. Użycie optycznie transparentnego hydrożelu było konieczne do obserwacji niezaburzonej fluorescencji obu uwalnianych substancji modelowych. Zmierzone podczas eksperymentu pole stężenia uwolnionej substancji stanowiło dane wejściowe dla przygotowanego dwuwymiarowego modelu numerycznego, uwzględniającego skład materiału jak również kinetykę uwalniania substancji. Tak prowadzone badania pozwoliły na optymalizację składu materiału a także wyznaczenie rozkładu stężenia w funkcji odległości od materiału dla różnych czasów eksperymentu. Otrzymane informacje pozwolą na estymację efektywności terapii lub lokalnej toksyczności uwalnianej substancji. Metodologia przedstawiona w niniejszej części została wykorzystana do optymalizacji materiałów neuroprotektynnych stosowanych w zapobieganiu neurodegeneracji spowodowanej operacjami neurochirurgicznymi przeprowadzonymi na modelu zwierzęcym [150], [151], omówionych w rozdziale piątym.

Na potrzeby eksperymentów w hydrożelu, wykorzystano sześć materiałów zawierających Rodaminę B (Tab.4.1, materiały MR1- MR6) oraz dwa materiały zawierające BSA-FITC (Tab. 4.3, materiały MBF1 - MBF2). W momencie umieszczenia wyciętych materiałów na hydrożelu PVA, rozpoczynano rejestrację intensywności fluorescencji uwalnianych analogów leków. Czas pomiędzy dwoma rejestrowanymi obrazami wynosił 5 minut. Zebrane dane poddano obróbce zgodnie z procedurą przedstawioną w rozdziale

drugim. Dla większej przejrzystości, na poniższych wykresach przedstawiono co dziesiąty punkt eksperymentalny. Współczynniki kinetyczne modelu numerycznego (podrozdział 3.3.4.) zostały dobrane dla danych eksperymentalnych stężenia w funkcji czasu w punkcie P odległym od materiału o 1,5 mm. Następnie, dla otrzymanych wartości współczynników k_a i k_d , porównano profile z obliczeń numerycznych i danych eksperymentalnych stężenia substancji w funkcji odległości od implantu wzdłuż linii L (Rys. 3.11).

Wyznaczanie współczynnika dyfuzji w porach między nanowłóknami wypełnionymi hydrożelem

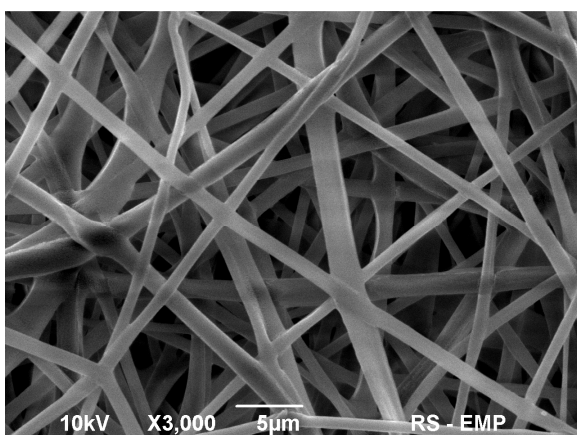
Procedura wyznaczania współczynnika dyfuzji pomiędzy włóknami zebranymi na szkiełku mikroskopowym była identyczna jak w przypadku pomiaru w czystym żelu PVA sieciowanym boraksem (rozdział 2). Włókna zbierane na szkiełku mikroskopowym wytworzono techniką elektroprzędzenia emulsji zawierającej białko BSA-FITC. Umieszczenie białka BSA-FITC w nanowłóknach posłużyło do wizualizacji w włókien na szkiełku oraz Rodaminy B rozpuszczonej w hydrożelu w trakcie eksperymentu FRAP. W trakcie prowadzenia badań okazało się, iż obecna w hydrożelu Rodamina B bardzo szybko adsorbowała na powierzchni nanowłókien, dając informację na temat położenia nanowłókien na szkiełku mikroskopowym (Rys. 4.55c-f). Jest to również bezpośredni dowód wpływu adsorpcji na proces uwalniania substancji z powierzchni nanowłókien. Badania dyfuzji w hydrożelu PVA bez włókien porównano z nanowłókniną o morfologii przypadkowej (Rys. 4.55c-d) oraz ukierunkowanej (Rys. 4.55e-f). Współczynnik dyfuzji Rodaminy B w hydrożelu PVA wyniósł: $D_{PVA} = 6,3 \pm 1,1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, pomiędzy nanowłóknami ułożonymi przypadkowo $D_{przyp} = 1,5 \pm 0,6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, zaś pomiędzy włóknami ukierunkowanymi $D_{ukier} = 5,3 \pm 0,9 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Zauważalny spadek wartości współczynnika dyfuzji Rodaminy B pomiędzy włóknami może mieć istotny wpływ na proces uwalniania i transportu leku z elektroprzędzonych materiałów i w dużej mierze będzie zależał od porowatości otrzymanego materiału.



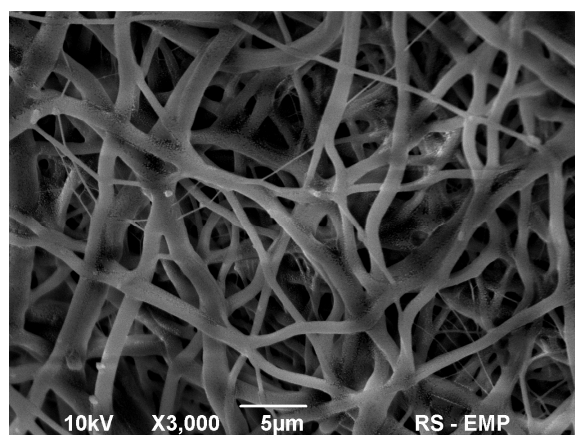
Rys. 4.55. Zdjęcia wykonane podczas badań metodą FRAP wykonanego w celu określenia współczynnika dyfuzji Rodaminy B pomiędzy nanowłóknami. a) preparat hydrożelu PVA tuż po wyświeceniu, b) ten sam preparat po 100 sekundach badania, c) preparat hydrożelu PVA z nanowłóknami ułożonymi w sposób przypadkowy tuż po wyświeceniu, d) ten sam preparat po 20 sekundach badania, e) preparat hydrożelu PVA z nanowłóknami ułożonymi w sposób ukierunkowany tuż po wyświeceniu, f) ten sam preparat po 20 sekundach badania.

Analiza mikroskopowa nanowłókien

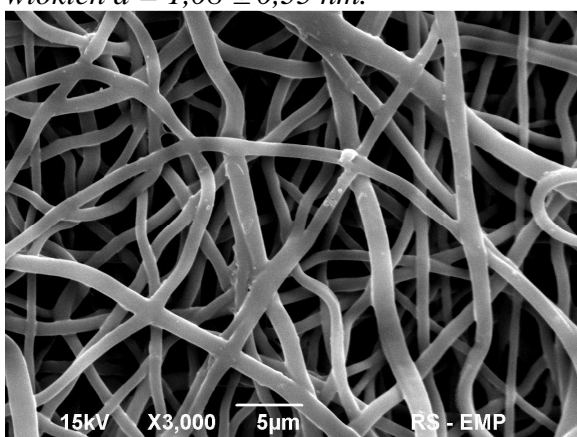
Materiały (MBF1 i MBF2), wytworzone z dwóch różnych polimerów, po przeprowadzonym eksperymencie uwalniania w hydrożelu PVA – boraks, zostały dodatkowo badane pod mikroskopem elektronowym. Celem było zbadanie wpływu alkalicznego środowiska hydrożelu na powierzchnię nanowłókien lub morfologię materiału. Po czterech dniach prowadzenia eksperymentu materiały przepłukano wodą destylowaną aby usunąć hydrożel i pozostawiono do wyschnięcia. Obrazy mikroskopowe wykazały brak zmian w morfologii oraz na powierzchni nanowłókien w przypadku materiału wykonanego z polimeru PDLG (porównaj Rys. 4.56 i 4.58). Zauważono niewielkie zmiany w postaci mniejszej liczby cienkich włókien w przypadku materiału z polimeru PLC (porównaj Rys. 4.57 i 4.59).



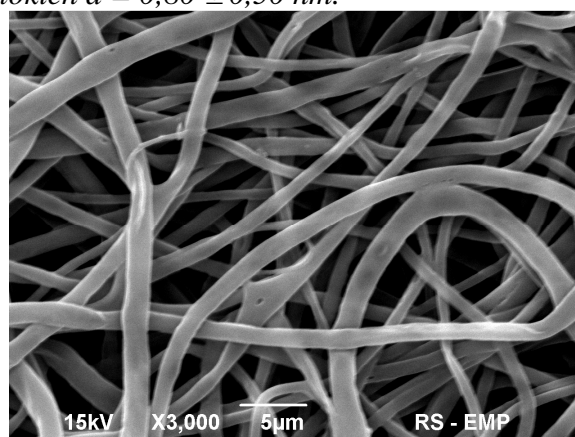
Rys. 4.56. Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MBF1). Grubość włókien $d = 1,08 \pm 0,35$ nm.



Rys. 4.57. Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MBF2). Grubość włókien $d = 0,80 \pm 0,50$ nm.



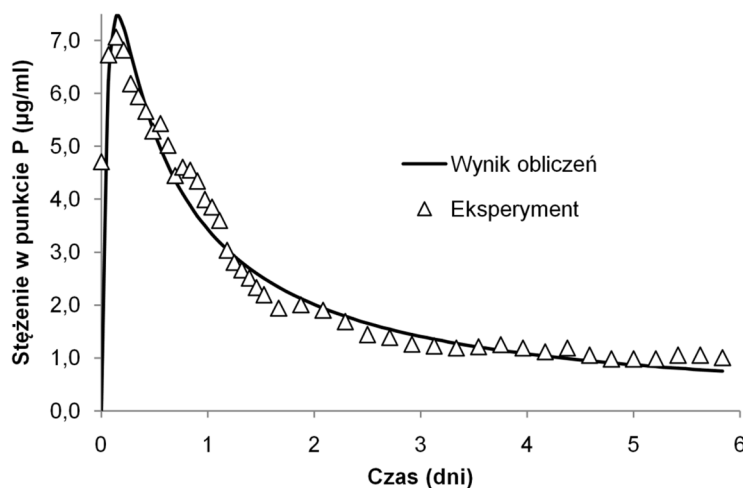
Rys. 4.58. Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PDLG (MBF1). Materiał analizowany po czterech dniach procesu uwalniania w hydrożelu PVA. Grubość włókien $d = 1,03 \pm 0,34$ nm.



Rys. 4.59. Obrazy SEM powierzchni nanowłókien polimeru PLC (MBF2). Materiał analizowany po czterech dniach procesu uwalniania w hydrożelu PVA. Grubość włókien $d = 1,16 \pm 0,40$ nm.

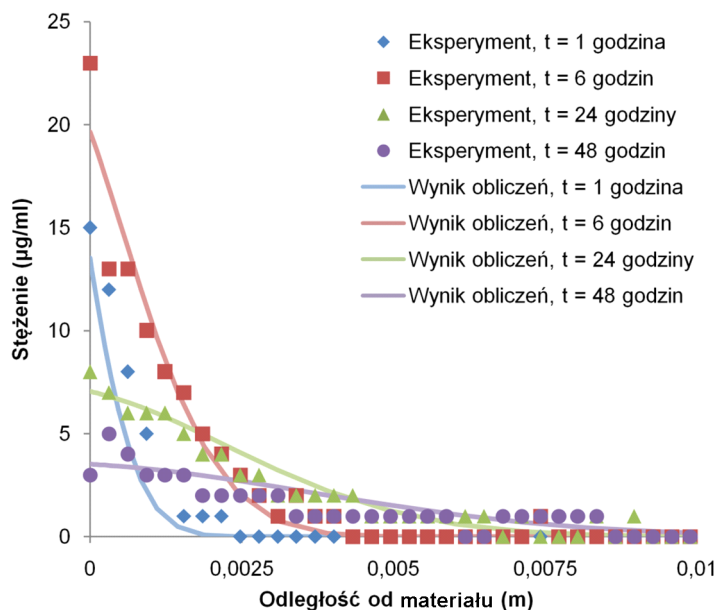
Wyniki uwalniania analogu leku lipofilowego– Rodaminy B

Materiał z PLLA zawierający Rodaminę B (MR1, Rys. 4.60) wykazał szybki wzrost stężenia w punkcie oddalonym od materiału o odległość P do poziomu 7 $\mu\text{g/ml}$, a następnie szybki spadek stężenia czynnika fluorescencyjnego do poziomu 1 $\mu\text{g/ml}$ utrzymującego się od 3 do 6 dnia eksperymentu. Otrzymany pik stężenia rodaminy był najniższy w porównaniu do materiałów z polimerów PLC i PDLG. Uzyskano dużą zgodność profili stężenia modelu numerycznego (makroskopowy, podstawowy) i danych eksperymentalnych.



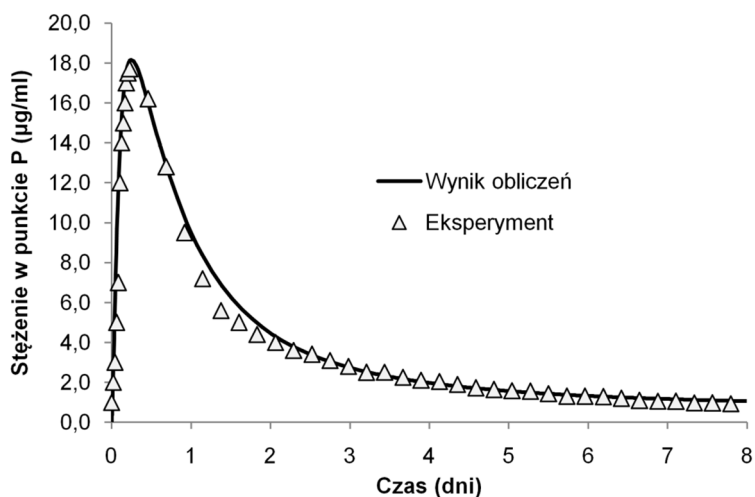
Rys. 4.60. Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PLLA, zawierający 2,7% Rodaminy B (MR1). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Na rysunku 4.61 przedstawiono porównanie profili stężenia w funkcji odległości od materiału dla czterech różnych czasów prowadzenia eksperymentu. Wyniki porównywano dla czasów: 1, 6, 24, 48 godzin. W przypadku materiału MR1, dla każdego z czasów uzyskano dokładne dopasowanie krzywych pochodzących z modelu makroskopowego. W pierwszej i szóstej godzinie eksperymentu, w bliskiej odległości od materiału uzyskano stężenie na poziomie 15 i odpowiednio 23 $\mu\text{g/ml}$. Na tym etapie eksperymentu, odległość wnikania Rodaminy B w hydrożelu była niewielka i wyniosła odpowiednio 2,5 i 4 mm. W dalszym etapie, dla 24 i 48 godzin prowadzenia eksperymentu, stężenie w bliskiej odległości materiału uległo zmniejszeniu z uwagi na zmniejszenie ilości uwalnianej Rodaminy B z materiału. Dla czasu 48 godzin odległość wnikania Rodaminy B w głąb hydrożelu była większa i wyniosła odpowiednio 6,2 i 9 mm.



Rys. 4.61. Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MRI. Poszczególne punkty przedstawiają stężenie dla różnych czasów eksperymentu. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

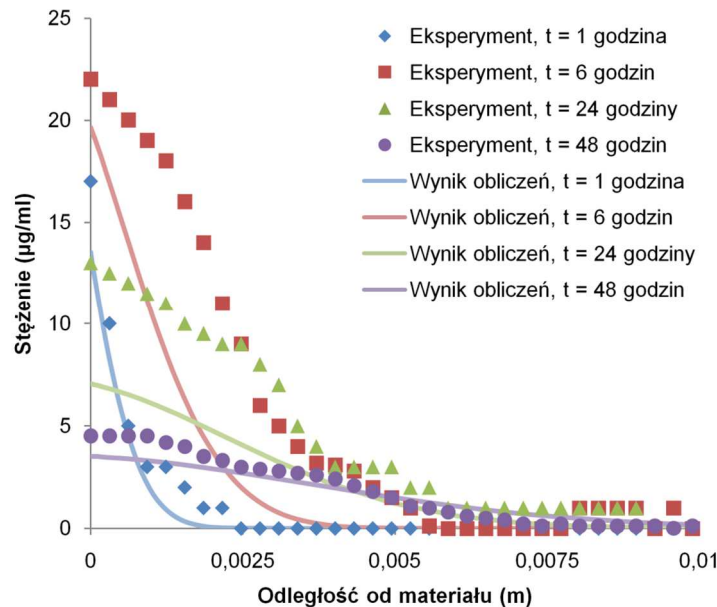
Materiał z PLC (MR2) spowodował równie szybki wzrost stężenia Rodaminy B w hydrożelu jak w przypadku materiału PLLA, a następnie gwałtowny spadek stężenia czynnika fluorescencyjnego do poziomu 1 µg/ml po 8 dniach trwania eksperymentu (Rys. 4.62). Osiągnięty pik stężenia był najwyższy z porównywanych materiałów PLLA i PDLG.



Rys. 4.62. Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PLC, zawierający 2,8% Rodaminy B (MR2). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

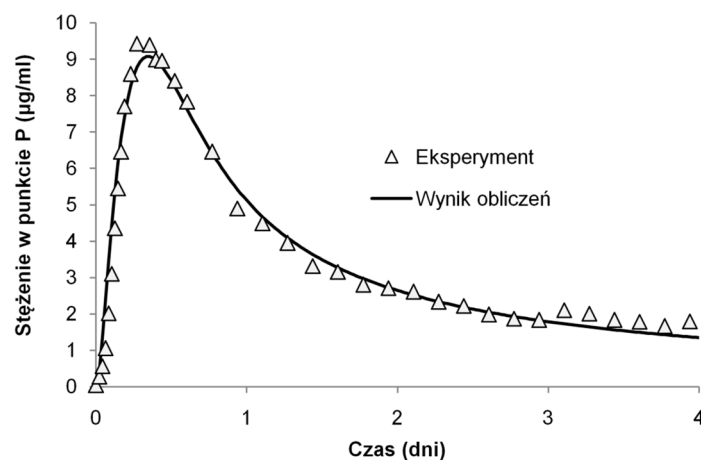
Dla materiału MR2 dopasowanie profilu modelu makroskopowego uzyskano jedynie dla danych z pierwszej i ostatniej godziny eksperymentu (Rys. 4.63). Dla danych z 6 i 24 godziny eksperymentu wynik stężenia rodaminy uzyskanych z modelu numerycznego był niedoszacowany. Dodatkowo, porównanie danych z 6 godziny eksperymentu wyniki

modelu numerycznego wykazały znacznie mniejszą głębokość dyfuzji Rodaminy B. Prawdopodobną przyczyną niedoszacowania szybszego uwalniania leku jest bardziej porowata struktura materiału niż uwzględniona w modelu numerycznym, umożliwiającą znacznie szybsze uwolnienie analogu leku do hydrożelu.



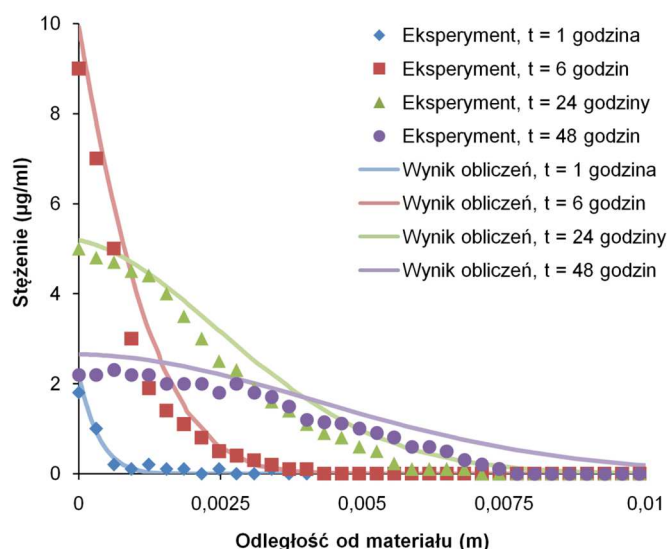
Rys. 4.63. Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR2. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Uwalnianie z materiału PDLG (MR3), charakteryzowało się mniejszą szybkością niż w przypadku materiałów z PLLA i PLC (Rys. 4.64). Maksymalną wysokość piku stężenia osiągnięto po 10 godzinach uwalniania, jednocześnie spadek stężenia w punkcie P był znacznie łagodniejszy niż dla omówionych materiałów. Otrzymano dobrą zgodność profilu stężenia z symulacji numerycznych z danymi eksperymentalnymi.



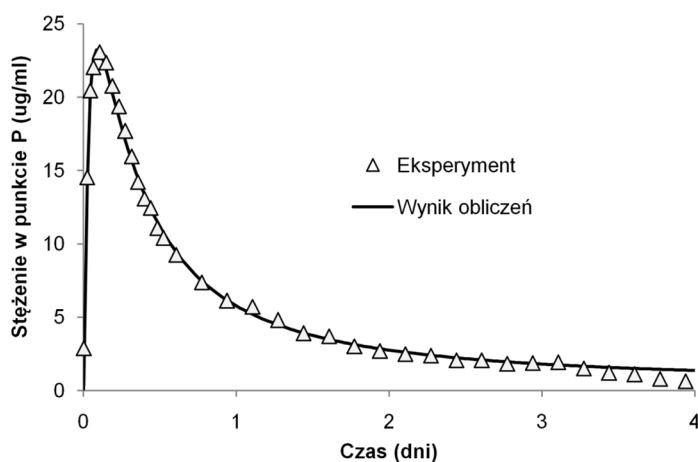
Rys. 4.64. Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PDLG, zawierający 2,8% Rodaminy B (MR3). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Dane z każdego z czasów eksperymentu prezentowały dobrą zgodność profili stężenia modelu makroskopowego i danych eksperymentalnych (Rys. 4.65). Jedyne przewidywana głębokość dyfuzji w głąb hydrożelu dla czasów 24 i 48 godzin była wyższa w modelu numerycznym niż w uzyskanych danych eksperymentalnych. Może to wynikać z uwzględnienia w modelu numerycznym izotropii dyfuzji w hydrożelu zamiast transportu anizotropowego, właściwego dla tego typu struktur.



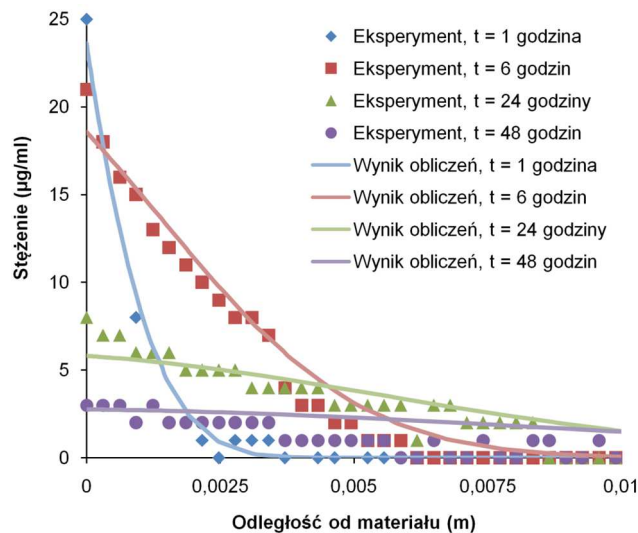
Rys. 4.65. Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR3. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Wzrost stężenia Rodaminy B z 2,8 do 4,4% wag. w materiale PDLG (MR4), spowodował znacznie gwałtowniejszy wzrost szybkości uwalniania oraz dwukrotnie wyższe stężenie rodaminy w punkcie P w porównaniu do materiału M3 (Rys. 4.66.). Jednocześnie, profil stężenia charakteryzował się znacznie gwałtowniejszym spadkiem stężenia po osiągnięciu maksimum na wysokości 23 µg/ml.



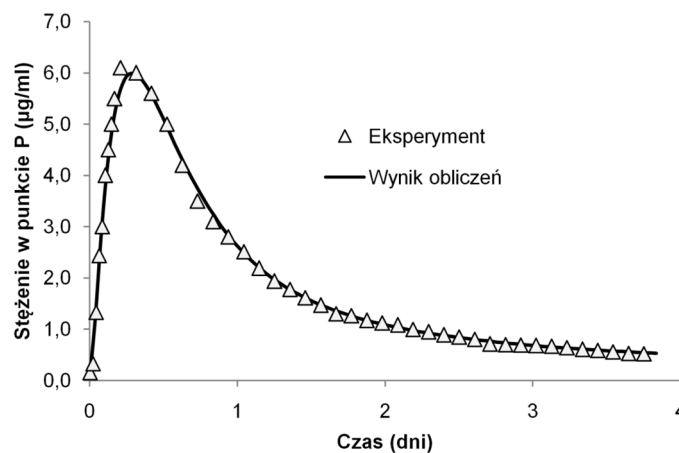
Rys. 4.66. Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PDLG, zawierający 4,4% Rodaminy B (MR4). Linia reprezentuje wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Podobnie jak w przypadku materiału MR3, największe różnice pomiędzy profilami stężenia występują dla danych eksperymentalnych dla 24 i 48 godzin od rozpoczęcia badań (Rys. 4.67). Zaobserwowano przeszacowanie stężenia w funkcji odległości od materiału w hydrożelu w modelu makroskopowym dla obu czasów eksperymentu. Nagły wzrost stężenia Rodaminy B w punkcie P (Rys. 4.66) został również zauważony w przebiegu profilu stężenia w funkcji odległości od materiału (Rys. 4.67), gdzie dla danych z 1 godziny eksperymentu otrzymano wyższe stężenie maksymalne Rodaminy B w pobliżu materiału.



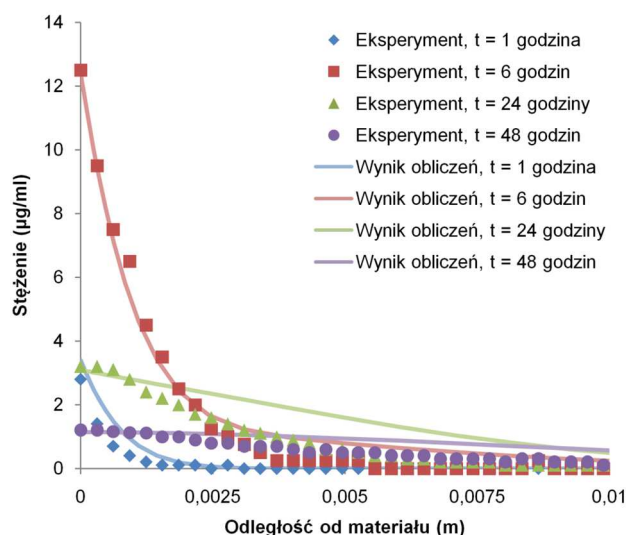
Rys. 4.67. Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR4. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Zastosowanie materiału typu warstwowego (MR5) spowodowało powolniejszy wzrost stężenia w punkcie P niż w przypadku typowego materiału MR2 (Rys. 4.68). Jest to spowodowane opóźnieniem transportu Rodaminy B przez warstwę materiału bez uwalnianej substancji. Dodatkowo zaobserwowano trzykrotnie niższe maksymalne stężenie w punkcie P w porównaniu do materiału MR2.



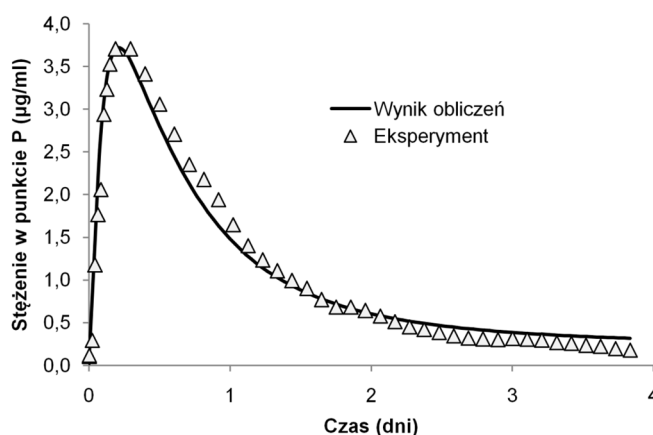
Rys. 4.68. Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał warstwowy, wykonany z polimeru PLC, zawierający 2,7% Rodaminy B (MR5). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Pomimo bardzo dobrego dopasowania współczynników kinetycznych modelu makroskopowego, zauważalne są duże różnice w profilach stężenia dla danych z 1, 24 i 48 godziny eksperymentu (Rys. 4.69). Wynik symulacji numerycznej znacząco przeszacował głębokość penetracji hydrożelu przez Rodaminę B. Wydaje się, że zastosowany w modelu jednowymiarowy warunek brzegowy płaszczyzny międzyfazowej wymaga modyfikacji i uwzględnienia równania dyfuzji w kierunku poprzecznym.



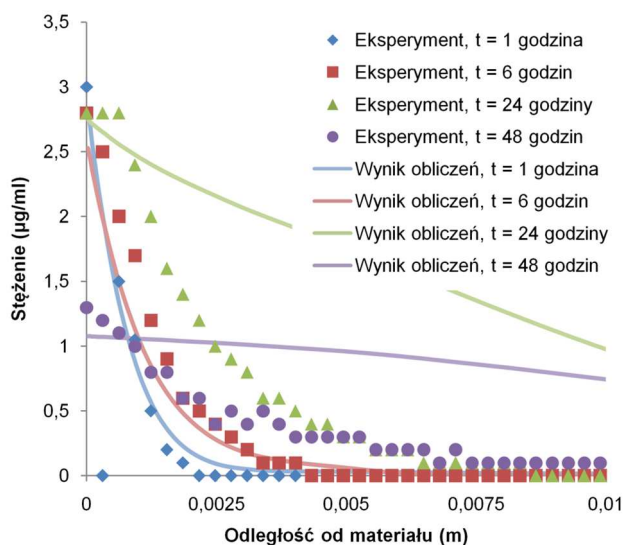
Rys. 4.69. Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału warstwowego (MR5). Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Materiał wytworzony techniką rdzeń w osnowie (MR6) wykazał się niewiele mniejszą początkową szybkością uwalniania w porównaniu do typowego materiału MR2 (Rys. 4.70). Zaobserwowano pięciokrotny spadek maksymalnego stężenia w punkcie P, spowodowany wolniejszym transportem składnika z rdzenia nanowłókna do jego powierzchni.



Rys. 4.70. Stężenie Rodaminy B w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PLC, zawierający 1,0% Rodaminy B (MR6). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

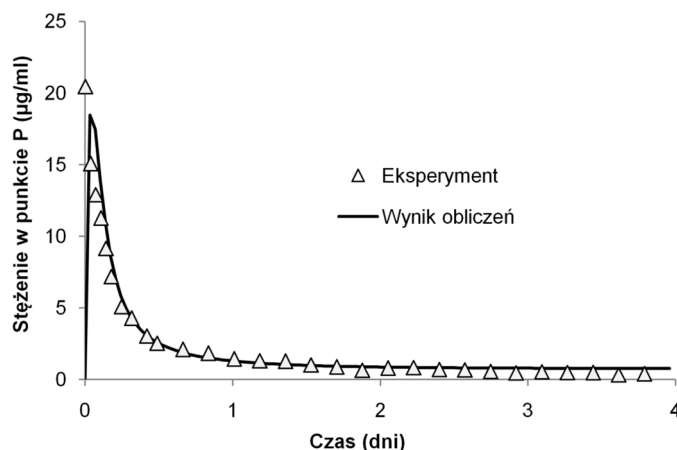
Wynik dopasowania profili stężenia dla materiału typu rdzeń w osnowie dla danych z 1 i 6 godziny eksperymentu jest zadowalający (Rys. 4.71). Można zauważyć, iż dla czasów 1, 6 i 24 godziny, stężenie składnika przy materiale jest jednakowe co wskazuje na stałą szybkość uwalniania składnika z materiału i odprowadzania substancji w głąb hydrożelu. Nie uzyskano dopasowania profili stężenia danych eksperymentalnych i numerycznych dla czasów 24 i 48 godzin. Jest to najprawdopodobniej spowodowane nie uwzględnieniem w modelu numerycznym dyfuzji Rodaminy B przez nanopory osnowy polimerowej, który to proces jest najwolniejszym etapem transportu substancji z materiału.



Rys. 4.71. Stężenie Rodaminy B w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MR6. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

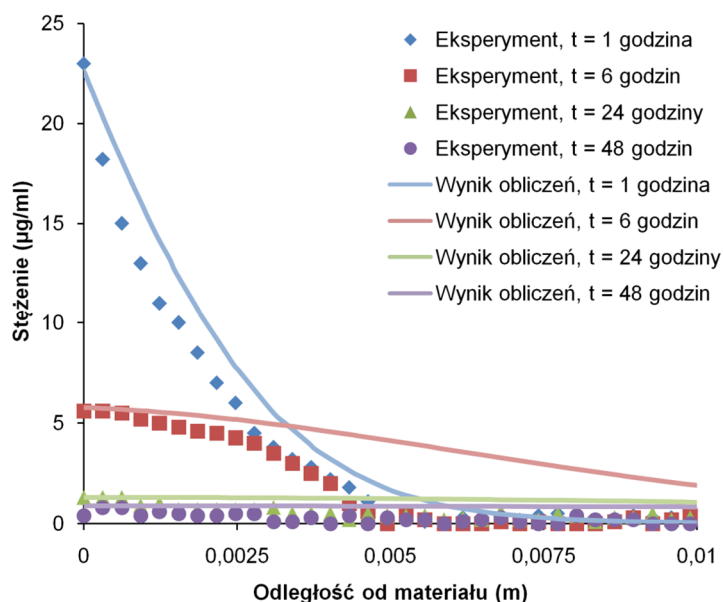
Wyniki uwalniania analogu leku hydrofilowego – BSA-FITC

Materiał wytworzony techniką elektroprzędzenia z emulsji polimeru PDLG (MBF1) charakteryzował się natychmiastowym wzrostem stężenia BSA-FITC w punkcie P, a następnie gwałtownym spadkiem do poziomu 1 µg/ml (Rys. 4.72). Przebieg profilu stężenia wskazuje na zjawisko niekorzystnego wyrzutu substancji z materiału, co może prowadzić do szybkiego przekroczenia wartości granicznych stężenia toksycznego.



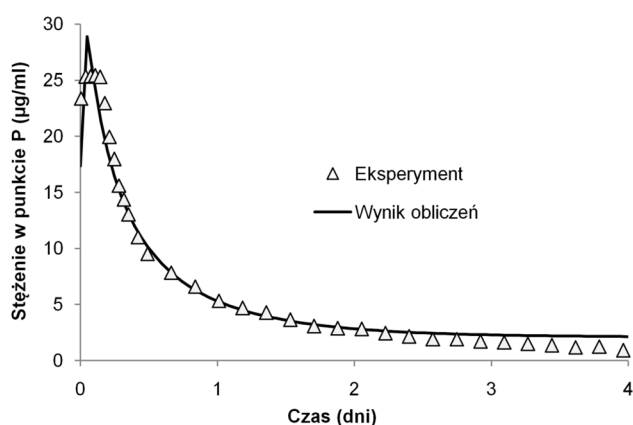
Rys. 4.72. Stężenie białka BSA-FITC w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PDLG, zawierający 2,7% BSA-FITC (MBF1). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Dla każdego z analizowanych czasów eksperymentu, pojawia się dość znaczące przeszacowanie stężenia w modelu makroskopowym (Rys. 4.73). Dla danych z 1 godziny, na całej długości odcinka L, przewidywane w modelu stężenie znacznie przewyższało stężenie z eksperymentu. W pozostałych przypadkach, różnica pomiędzy profilami stężenia przy materiale była niewielka, natomiast zwiększała się w miarę oddalania od materiału. Jest to prawdopodobnie spowodowane obecnością większości kropeł z fazą wodną bliżej rdzenia włókna i brakiem możliwości uwzględniania tego typu mikrostruktury w modelu makroskopowym.



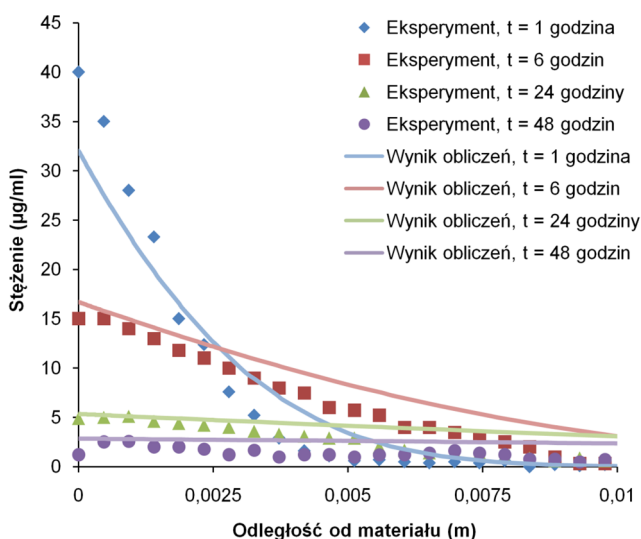
Rys. 4.73. Stężenie białka BSA-FITC w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MBF1. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Zastosowanie materiału wykonanego z polimeru PLC (MBF2), również spowodowało gwałtowny wyrzutem substancji z powierzchni nanowłókien do hydrożelu (Rys. 4.74). Otrzymana maksymalna wartość stężenia pików jest nieznacznie wyższa niż dla materiału MBF1 wykonanego z PDLG. Jednocześnie spadek stężenia przebiega znacznie łagodniejsze jak w przypadku poprzednim (Rys. 4.72). Tak szybkie uwalnianie BSA-FITC z nanowłókien wykonanych techniką elektroprzędzenia emulsji, może być spowodowane pękaniem i wylaniem zawartości kropeł znajdujących się najbliżej powierzchni nanowłókien.



Rys. 4.74. Stężenie białka BSA-FITC w punkcie P w funkcji czasu. Materiał wykonany z polimeru PLC, zawierający 2,7% BSA-FITC (MBF2). Linia reprezentuje wynik obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Uzyskano stosunkowo dokładne dopasowanie profili stężenia dla danych z każdego czasu eksperymentu (Rys. 4.75). Zaobserwowano niewielkie niedoszacowanie stężenia dla niewielkich odległości od materiału i przeszacowanie stężenia dla większych odległości od materiału wskazując na 7,5 (mm) głębokość dyfuzji już po pierwszej godzinie uwalniania.



Rys. 4.75. Stężenie białka BSA-FITC w hydrożelu w funkcji odległości od materiału MBF2. Linie reprezentują wyniki obliczeń numerycznych modelu makroskopowego (podstawowego).

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazują, że metoda ewaluacji uwalniania leków, wykorzystująca ośrodek hydrożelowy sprzężony z układem płaskiej wiązki laserowej, pozwala na uzyskanie dokładnych danych czasoprzestrzennych stężenia substancji uwalnianej z materiału. Porównanie przedstawionej metody fluorescencyjnej z metodą absorpcyjną Sindhwaniego i in. [124] wskazuje na lepszą dokładność opisanej w niniejszej pracy metody bezpośredniego wyznaczania stężenia. Przedstawiona metoda pozwala na uniknięcie niedokładnego procesu rzutowania trójwymiarowego rozkładu stężenia na rozkład dwuwymiarowy (transformacja Abela).

Porównanie współczynników kinetycznych uzyskanych z modelu numerycznego dla uwalniania do roztworu PBS oraz hydrożelu PVA (Tab. 4.6) wskazuje, że dla tych samych materiałów, uzyskane współczynniki desorpcji są dwa rzędy wielkości większe w przypadku uwalniania do hydrożelu PVA, z jednocześnie zbliżonymi wartościami współczynnika adsorpcji. Wskazuje to na uwolnienie większej ilości substancji w krótszym czasie do ośrodka hydrożelowego. Wzrost wartości stałej desorpcji w przypadku uwalniania do hydrożelu PVA może być spowodowany alkalicznym środowiskiem uwalniania, które wpływa na oddziaływania polimer – substancja aktywna i ułatwia desorpcję substancji z powierzchni nanowłókien.

Tab. 4.6. Współczynniki kinetyczne: szybkość desorpcji, szybkość adsorpcji, szybkość wymiany masy otrzymane na podstawie przeprowadzonych eksperymentów w modelach numerycznych (makroskopowym i mikroskopowym) dla materiałów analizowanych w hydrożelu PVA oraz buforze PBS.

Nr materiału	k_d ($m^3/kg \cdot s$)		k_a (1/s)		k_c (m/s)	
	PVA (10^{-4})	PBS (10^{-5})	PVA (10^{-6})	PBS (10^{-5})	PVA (10^{-7})	PBS (10^{-10})
MR1	0,9	0,2	4,5	2,1	0,2	0,12
MR2	2,1	0,98	3,1	0,09	0,6	6
MR3	1,4	0,52	6,7	0,44	1,4	32
MR4	0,76	1,0	0,01	0,35	0,1	35
MR5	0,8	0,9	5,3	0,03	0,5	3
MR6	0,5	0,23	4,9	0,15	1,9	1
MBF1	2,5	1,2	2,5	1,1	2,2	0,27
MBF2	3,1	5,6	24	6,5	2,3	0,24

Porównując materiały z polimerów PLLA (MR1), PLC (MR2), PDLG (MR3) można zaobserwować iż w przypadku uwalniania do hydrożelu PVA jak również buforu PBS, najwolniejsze uwalnianie występuje dla materiału z PLLA (Tab.4.6). Jednakże różnica

między materiałami w uwalnianiu do hydrożelu nie była tak duża jak w przypadku uwalniania do buforu fosforanowego. Współczynniki desorpcji w buforze wskazują na pięciokrotnie szybszą desorpcję z włókien PLC (MR2) w porównaniu do włókien PLLA (MR1), podczas gdy w trakcie uwalniania do hydrożelu desorpcja jest jedynie dwukrotnie większa dla materiału PLC (MR2). Dla przypadku uwalniania z materiału zawierającego 2,8% Rodaminy B (MR3), desorpcja i adsorpcja była dwukrotnie i siedemdziesięciokrotnie szybsza niż w przypadku materiału zawierającego 4,4% Rodaminy B (MR4). Szybsza adsorpcja skutkowała ponad dwukrotnie mniejszym maksimum stężenia (porównaj Rys. 4.64 i 4.66). Podobnie jak w eksperymentach i symulacjach uwalniania z materiałów warstwowego oraz typu rdzeń w osnowie do buforu PBS (MR5 i MR6), również uwalnianie do hydrożelu było znacznie wolniejsze w porównaniu do typowego materiału PLC (MR2). Uzyskane współczynniki desorpcji były dwukrotnie i czterokrotnie niższe odpowiednio dla materiału MR5 i MR6, w porównaniu do typowego materiału MR2.

Wyniki uwalniania dla materiałów elektroprzędzonych z emulsji wskazują na niewiele szybszą desorpcję i wolniejszą adsorpcję składnika z powierzchni polimeru PLC (MBF2). Efekt ten może być związany z obecnością większej ilości kropeł fazy wodnej zawierającej BSA-FITC przy powierzchni nanowłókien lub większą powierzchnią właściwą materiału związaną z mniejszą grubością otrzymanych nanowłókien.

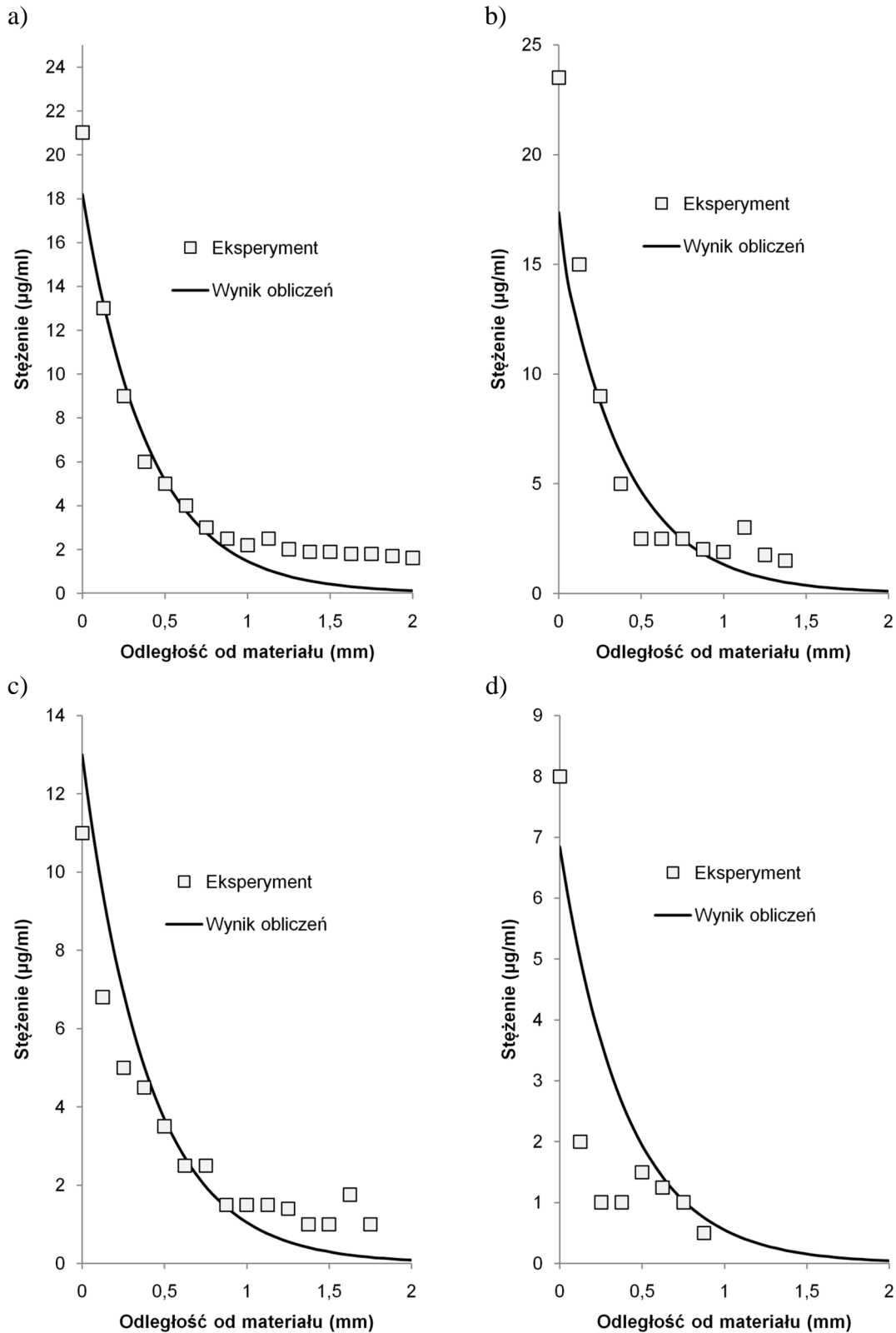
Aby dokładniej porównać różnice w szybkościach uwalniania z materiałów różniących się rodzajem użytego polimeru, parametry procesu elektroprzędzenia powinny być dobrane w ten sposób aby otrzymać jednakowe rozkłady grubości nanowłókien oraz porowatości materiałów. Jak pokazane będzie w kolejnych podrozdziałach, wpływ ukierunkowania czy też porowatości materiału może znacząco zmienić szybkość uwalniania substancji aktywnej z materiału.

Wyniki symulacji numerycznych dostarczyły informacji o polu stężenia dla różnych parametrów materiałowych takich jak: stężenie początkowe analogu w materiale, porowatość lub grubość nanowłókien w materiale. Informacja o stężeniu w funkcji odległości od implantu pozwala określić skuteczność terapii poprzez np. stwierdzenie stężeń powyżej granicy toksyczności lub wartości poniżej minimalnego stężenia terapeutycznego. Wyniki symulacji numerycznych omówionego modelu mogą posłużyć dla optymalizacji dyfuzji leku *in vivo* w eksperymencie prowadzonym na modelu zwierzęcym [116], [152].

4.3. Analiza parametryczna modeli numerycznych

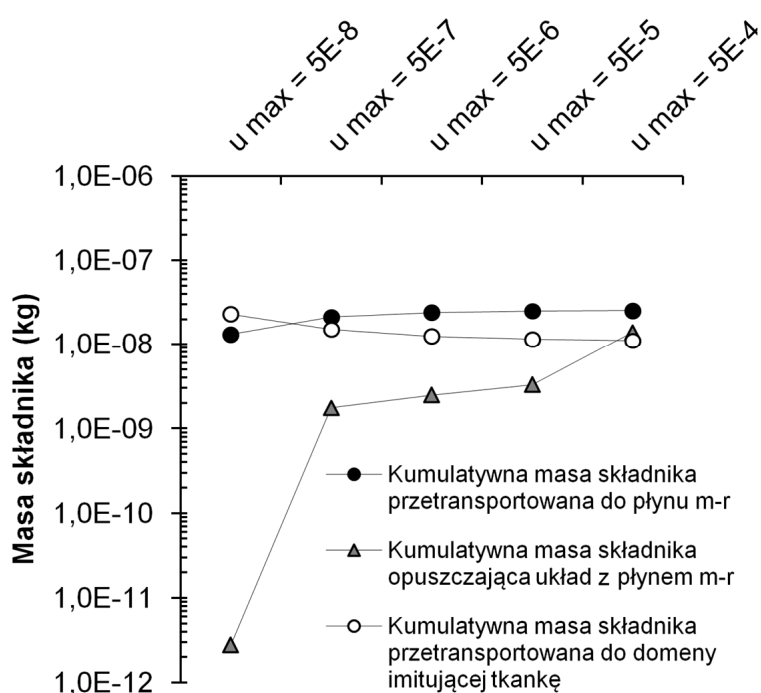
4.3.1. Model dwuwymiarowy (rozszerzony bez pulsacji płynu mózgowo - rdzeniowego)

Przedstawiony w rozdziale trzecim model matematyczny opisujący transport substancji w materiale i hydrożelu został eksperymentalnie zwalidowany w podrozdziale 4.2. W niniejszej części pracy rozbudowano opisany model numeryczny o zjawiska fizyczne, których wpływu nie można było zbadać eksperymentalnie. Uwzględniono m.in. stałą szybkości reakcji eliminacji w tkance mózgowej odzwierciedlonej domeną Ω_2 . Wartość współczynnika reakcji eliminacji dla białka NGF została wybrana na podstawie pracy Krewsona i Saltzmana [116] i wynosi $k_{elim} = 2,5 \cdot 10^{-4}$ 1/s. W tej pracy, przeprowadzono badania autoradiograficzne płaskich fragmentów tkanki mózgowej zawierającej znakowane izotopem ^{125}I białko NGF. Białko uwalniano z implantu poli(etylen-co-octan winylu) (EVAc) z dodatkiem białka BSA. Na rysunkach 4.76a-d przedstawiono dane eksperymentalne stężenia (^{125}I)NGF w funkcji odległości od implantu [116] wraz wynikiem modelu numerycznego (makroskopowego) opracowywanego w niniejszej pracy. Autorzy cytowanej pracy nie zawarli informacji na temat porowatości, dlatego przyjęto porowatość rzędu 10% (wzięto pod uwagę technikę wytworzenia implantu). Współczynnik dyfuzji wykorzystany w obliczeniach wynosił $D_{NGF} = 6,3 \pm 1,1 \cdot 10^{-11}$ m²/s. W niniejszej pracy uzyskano zadowalające dopasowanie profili stężenia dla każdego z czasów eksperymentu. Wynik modelu numerycznego wskazuje na większy spadek stężenia dla drugiego dnia od implantacji. Jak można zauważyć przewidywana głębokość dyfuzji białka dla każdego z czasów od implantacji jest jednakowa i wynosi 2 (mm), zaś zmienia się jedynie stężenie w niewielkiej odległości od implantu wskazując na coraz wolniejsze uwalnianie białka z materiału. Powolna dyfuzja w głąb tkanki i niska maksymalna głębokość dyfuzji jest związana z procesem eliminacji substancji w wyniku wielu procesów fizycznych i biochemicznych.



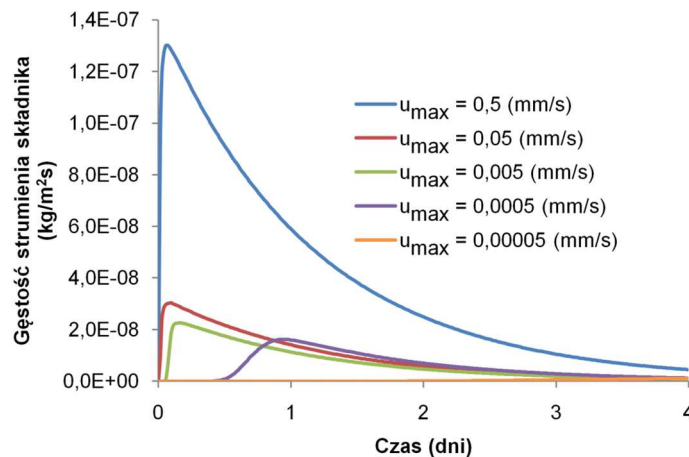
Rys. 4.76. Stężenie (^{125}I)NGF w funkcji odległości od materiału polimerowego dla a) 1 dnia b) 4 c) 7 i d) 14 dni od implantacji. Dane eksperymentalne stężenia NGF w funkcji odległości od materiału implantowanego w modelu zwierzęcym wykorzystano z pracy Krewsona i Saltzmana [116]. Dopasowanie profilu stężenia (linia ciągła) wykonano z użyciem modelu numerycznego (makroskopowego) opracowanego w niniejszej pracy.

W kolejnym etapie niniejszej pracy rozbudowywano dwuwymiarowy model numeryczny. W domenie znajdującej się nad materiałem, uwzględniono przepływ płynu symulującego płyn mózgowo-rdzeniowy (porównaj rozdziały 3.3.4. i 3.3.5.). Przepływ taki może mieć istotny wpływ na szybkość uwalniania substancji z materiału stosowanego jako opatrunek. Wprowadzono dodatkową domenę płynu (Ω_3) z warunkami brzegowymi uwzględniającymi profil prędkości płynu. Przeanalizowano wpływ prędkości maksymalnej płynu m-r na ilość składnika przeniesioną w kierunku domeny reprezentującej tkankę (Ω_2), płyn (Ω_3) oraz odprowadzoną wraz z płynem z układu (Γ_5). Wyniki symulacji numerycznych potwierdzają znaczny wzrost masy składnika przenoszonego do domeny płynu wraz ze wzrostem prędkości przepływu płynu po 3 dniach od rozpoczęcia uwalniania (Rys. 4.77.). Zwiększanie prędkości przepływu płynu powoduje dopływ w okolicę materiału płynu bez uwalnianego składnika, zwiększając tym samym różnicę stężeń pomiędzy domenami i transport składnika. Informacja o przewidywanej ilości składnika opuszczającego materiał i przedostającego się do krwioobiegu jest istotna z punktu widzenia prowadzonej terapii, gdyż może pomóc w ocenie skutków ubocznych uwalniania substancji z implantu.



Rys. 4.77. Wpływ prędkości maksymalnej (m/s) przepływu płynu na masę składnika przeniesioną z materiału do płynu (okrągłe czarne punkty) oraz domeny reprezentującej tkankę (okrągłe białe punkty). Dodatkowo, przedstawiono masę składnika opuszczającą układ wraz z płynem (szare trójkąty). Przedstawione dane otrzymano w wyniku obliczeń numerycznych dla czasu równego 3 dni.

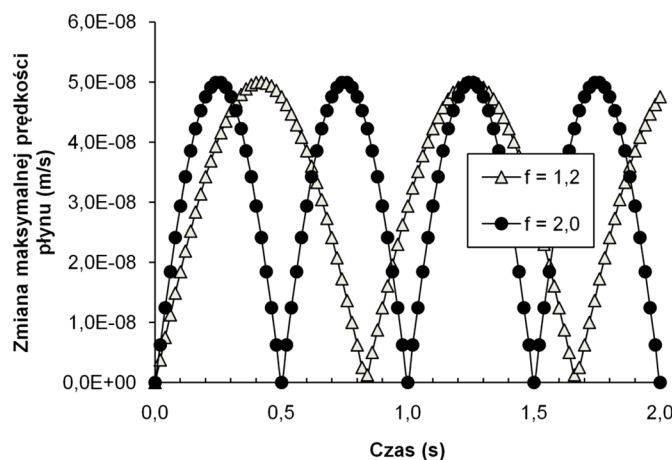
Na rysunku 4.78 przedstawiono wpływ prędkości przepływu płynu na gęstość strumienia składnika opuszczającego domenę wraz z płynem. Największą ilość substancji przeniesionej do płynu, a następnie wraz z płynem poza układ, występuje przy prędkości maksymalnej płynu równej 0,5 mm/s. Wraz ze spadkiem prędkości maksymalnej płynu maleje również gęstość strumienia składnika co jest związane ze zwiększeniem strumienia dyfuzji w kierunku domeny reprezentującej tkankę. Pik maksymalnego strumienia substancji ulega przesunięciu z uwagi na wydłużenie czasu konwekcyjnego unoszenia składnika wraz z płynem do brzegu modelowanego układu.



Rys. 4.78. Wpływ prędkości płynu na gęstość strumienia uwalnianego składnika opuszczającego domenę wraz z płynem.

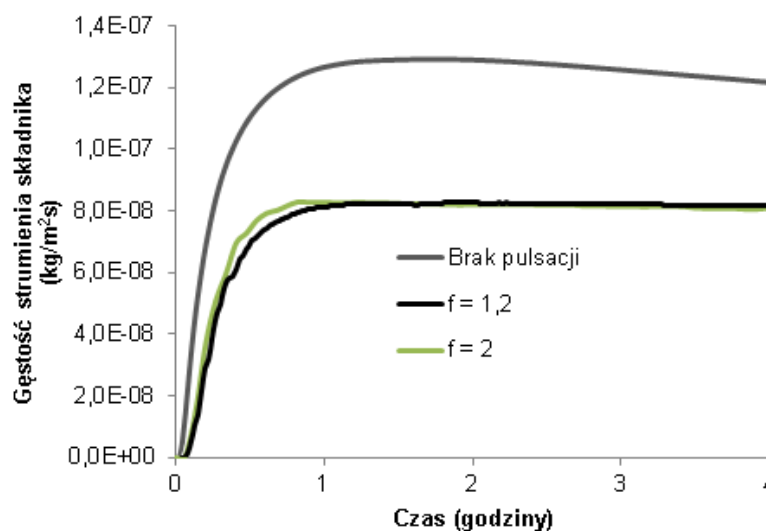
4.3.2. Model dwuwymiarowy uwzględniający pulsacje przepływu płynu mózgowo-rdzeniowego

Przeprowadzono również symulacje numeryczne uwzględniające uproszczony profil pulsacji przepływu płynu mózgowo - rdzeniowego. Wprowadzono dwie typowe częstości pulsacji związane z częstością akcji serca: 72 i 120 uderzeń na minutę (Rys. 4.79).



Rys. 4.79. Wpływ częstości akcji serca na przebieg maksymalnej prędkości płynu mózgowo-rdzeniowego (Równanie 3.88). Przebieg ten zastosowano jako warunek brzegowy w symulacjach numerycznych modelu dwuwymiarowego, rozszerzonego.

Na wykresie 4.80 przedstawiono porównanie wpływu dwóch częstotliwości pulsacji i ich braku na gęstość strumienia substancji opuszczającego domenę wraz z płynem. Symulacje przeprowadzono dla maksymalnej prędkości przepływu równej $u_{\max} = 0,5$ mm/s. Czas uwalniania substancji skrócono z 4 dni do 4 godzin z uwagi na zastosowanie znacznie mniejszego kroku czasowego równego 0,1 sekundy. Dzięki temu dokładnie odwzorowano przebieg pulsacji stosowanych w warunkach brzegowych. Krzywe gęstości strumienia składnika dla obu częstotliwości pulsacji poddano konwersji do pojedynczej linii stosując metodę średniej kroczącej. Dzięki tej operacji uzyskano znacznie lepszą przejrzystość wykresu. Amplituda pulsacji gęstości strumienia leku w obu przypadkach wynosiła około $2 \cdot 10^{-8}$ kg/m²s (czego nie pokazano na rysunku 4.80). Dla obu częstotliwości pulsacji można zauważyć iż jedynie w początkowej fazie odprowadzania substancji z układu występuje niewielka różnica pomiędzy profilami gęstości strumienia składnika. W dalszym etapie, krzywe gęstości strumienia są do siebie zbliżone a ich przebieg w czasie ma mniejszą tendencję spadkową aniżeli obserwujemy to w przypadku braku pulsacji (Rys. 4.80). Różnica pomiędzy wynikami dla braku pulsacji i pulsacji płynu ($f = 1,2 - 2$) dla czasu 1,5 godziny od rozpoczęcia uwalniania, wskazuje na blisko półtorakrotny spadek gęstości strumienia składnika przy wystąpieniu pulsacji płynu.

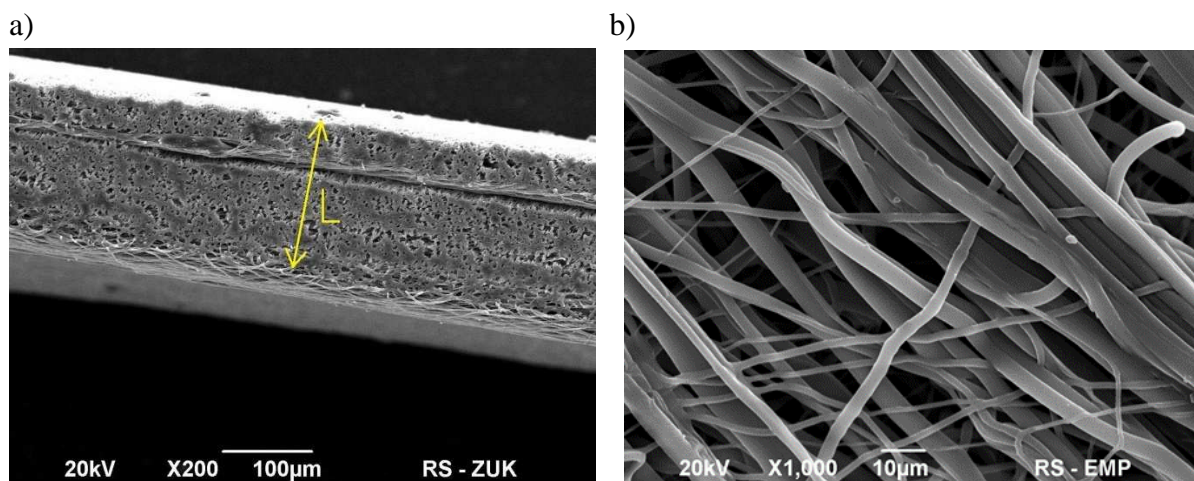


Rys. 4.80. Wpływ częstości pulsacji przepływu płynu na gęstość strumienia składnika opuszczającego domenę wraz z płynem. Do obliczeń wykorzystano prędkość $u_{\max} = 0,5$ mm/s.

4.3.3. Model trójwymiarowy (podstawowy)

Podstawową funkcją, jaką muszą spełnić systemy uwalniania leków jest kontrola przebiegu procesu uwalniania tak, aby w możliwie automatyczny sposób zapewnić

optymalną, skuteczną kurację. Często wymaga to zapewnienia stałego dawkowania uwalnianego leku w okresach tygodniowych a nawet miesięcznych. Zastosowanie odpowiednio dobranej struktury wewnętrznej włókna np. współosiowy rdzeń z lekiem i powłoką polimerową (rdzeń - osnowa) [153]–[156] czy też przędzone z emulsji woda w oleju włókna zawierające krople z substancją aktywną, może wpłynąć na szybkość podawania leku. Podobnie mikrostruktura materiału z ukierunkowanymi równoległymi włóknami [77] lub zamknięcie warstwy nanowłókien z lekiem pomiędzy dwoma warstwami nanowłókien bez leku (wielowarstwowa kanapka) [54], [70], [73], [90], dzięki dobraniu optymalnej grubości warstw osłaniających może spowolnić uwalnianie oraz zmniejszyć niebezpieczny początkowy wyrzut leku. Bardzo ważne zatem wydaje się przeanalizowanie wpływu modyfikacji geometrycznych systemu włókien w macie na desorpcję i dyfuzję leku w materiale uwalniającym substancje aktywne.

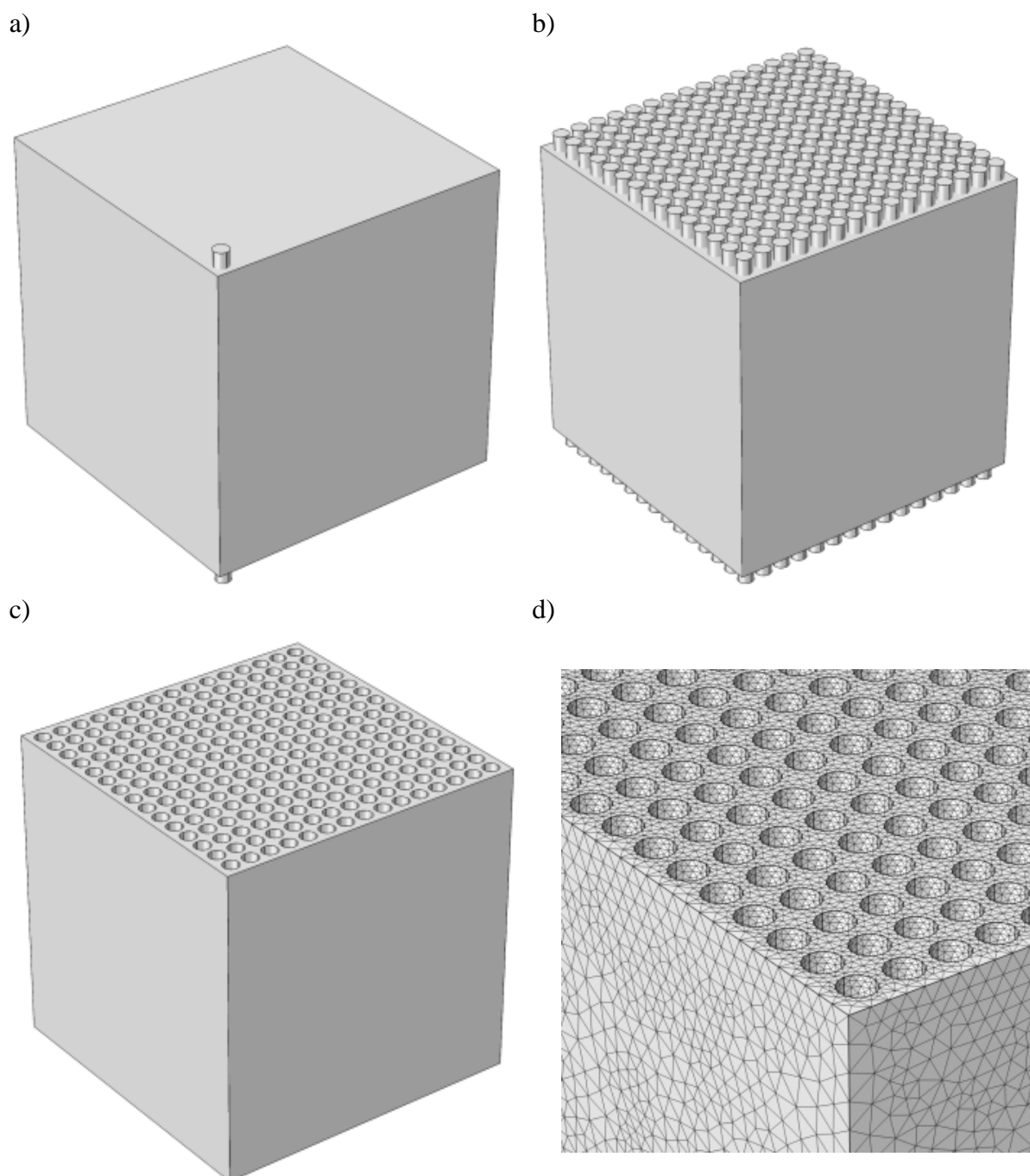


Rys. 4.81. a) Widok boczny siatki nanowłókien dla fragmentu modelowanego materiału, długość L równa jest $100\ \mu\text{m}$ b) Widok powierzchni nanowłókien.

W tej części pracy starano się oszacować wpływ poszczególnych parametrów mikro i makrostruktury na proces uwalniania leków z mat wykonanych z nanowłókien, które były wykorzystywane przez zespół z IPPT i IMDiK jako opatrunki neuroprotektyjne w zapobieganiu nieprawidłowemu bliznowaceniu tkanki mózgowej [150], [157]. Dla szeregu takich struktur maty przeprowadzona została jakościowa i ilościowa analiza procesów transportu leku, która jest niezbędnym etapem projektowania systemu uwalniania leków.

W celu wykonania symulacji numerycznych wygenerowano siatkę obliczeniową dla sześcianu o wymiarze $L = 100\ \mu\text{m}$, w którym umieszczono 225 włókien dla trzech typowych dla eksperymentu promieni włókien $r = 1, 2, 2,5\ \mu\text{m}$. Wymiar boku sześcianu

obliczeniowego odpowiada średniej grubości rzeczywistego materiału. Zmiana konfiguracji geometrii włókien i porowatości wymagała w każdym przypadku wygenerowania odpowiedniej liczby włókien o zadanej charakterystyce a następnie odjęciu ich objętości od domeny obliczeniowej (Rys. 4.82). Typowa siatka obliczeniowa dla rozpatrywanych konfiguracji zawiera od 2 do 4 mln czworosściennych elementów, a czas obliczeń jednego przypadku przekracza 4 dni.



Rys. 4.82. Kolejne etapy tworzenia geometrii obliczeniowej symulującej strukturę maty i umieszczonych w niej nanowłókien.

Na rysunku 4.81a przedstawiono widok brzegu maty zawierającej Rodaminę B, dla której została przeprowadzona analiza uwalniania analogu leku dla różnych konfiguracji jej struktury wewnętrznej. W celu skrócenia czasu obliczeń została wyodrębniona objętość sześcianu reprezentująca materiał modelowanej maty nanowłókniny, na którego bokach ustalono następnie odpowiednie warunki brzegowe. Na dwóch powierzchniach sześcianu równoległych do włókien, zastosowano warunki brzegowe Dirichleta, gdzie stężenie leku w płynie tuż przy ścianie wynosi $C_B = 0 \text{ kg/m}^3$. Warunek ten odpowiada sytuacji, w której powierzchnia ta graniczyłaby z ośrodkiem o nieskończonej objętości. Na pozostałych bokach sześcianu ustalono warunki brzegowe Neumanna, odpowiadające warunkowi symetrii w kierunku normalnym \vec{n} , co odpowiada przyjęciu okresowych warunków brzegowych w kierunkach X i Y. Jako warunek początkowy stężenia leku między włóknami przyjęto $C_{B0} = 0 \text{ kg/m}^3$, natomiast na powierzchni włókien w chwili początkowej przyjęto wartość $C_A = C_A^{\max} = C_{A0}$, obliczoną ze składu cząstkowego materiału. Typowa wartość C_{A0} wynosi $10^{-3} \text{ kg leku/kg maty}$.

Ukierunkowanie nanowłókien i wpływ lokalnego zagęszczenia włókien na proces uwalniania leku

Jednym z ważniejszych parametrów analizowanych mat jest ukierunkowanie włókien. Podczas procesu wytwarzania maty możliwe jest (w pewnym zakresie) sterowanie tym parametrem. Analiza numeryczna powinna odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu zmiana ułożenia włókien wpływa na proces dyfuzji leku. Geometrię odzwierciedlającą rzeczywiste ułożenie włókien i stopień ich ukierunkowania w domenie opisano tensorem drugiego rzędu [149]:

$$\mathbf{K} = \frac{1}{l_{\text{tot}}} \sum l_i \begin{bmatrix} \sin^2 \alpha_i \cos^2 \vartheta_i & \sin^2 \alpha_i \sin \vartheta_i \cos \vartheta_i & \cos \alpha_i \sin \alpha_i \cos \vartheta_i \\ \sin^2 \alpha_i \sin \vartheta_i \cos \vartheta_i & \sin^2 \alpha_i \sin^2 \vartheta_i & \cos \alpha_i \sin \alpha_i \sin \vartheta_i \\ \cos \alpha_i \sin \alpha_i \cos \vartheta_i & \cos \alpha_i \sin \alpha_i \sin \vartheta_i & \cos^2 \alpha_i \end{bmatrix} \quad (4.5)$$

gdzie: l_i to długość i -tego włókna (dla włókien równoległych długość do krawędzi domeny jest równa L), zaś l_{tot} to suma wszystkich długości włókien. Wartość α_i określa kąt pomiędzy i -tym włóknem a osią Z układu współrzędnych, zaś wartość ϑ_i określa kąt pomiędzy i -tym włóknem a płaszczyzną XY. Ślad tensora jest zawsze równy jedności. Dla włókniny izotropowej tensor omega wynosi $\mathbf{K}_t = [\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}]$.

Rozpatrujemy strukturę regularną tzn. w badanym obszarze równomierne rozłożenie włókien o stałej średnicy. Odległość między włóknami jest funkcją porowatości lub

struktury. Współczynniki desorpcji i adsorpcji leku w każdym przypadku są jednakowe, zaś zmianie podlega współczynnik dyfuzji leku w płynie - D_i , który jest uśrednionym parametrem zależnym od porowatości ośrodka.

Zbadano dwa przypadki: równomiernie ułożonych włókien i w konfiguracji wiązek zagęszczonych włókien, dla przyjętych arbitralnie trzech porowatości:

- a) $\varepsilon_1 = 0,52$;
- b) $\varepsilon_2 = 0,72$;
- c) $\varepsilon_3 = 0,96$.

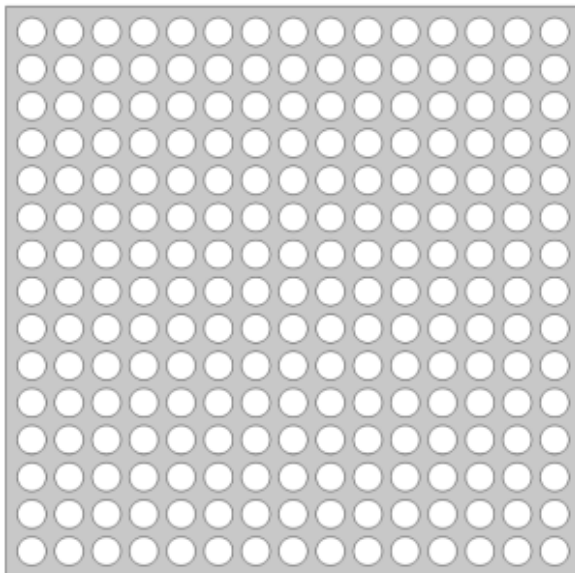
W tabeli 4.7 przedstawiono podstawowe parametry rozpatrywanych konfiguracji. Warto zwrócić uwagę, że dla włókien równomiernie ułożonych o największej porowatości maty ε_3 , współczynnik dyfuzji w żelu z włóknami jest taki sam jak w żelu bez włókien. W pierwszej kolejności obliczono szybkość uwalniania dla włókien w strukturze regularnej wypełniającej całą domenę obliczeniową (Rys. 4.83). W tym przypadku włókna znajdowały się w stałej odległości od siebie a porowatość zmieniano dostosowując średnicę włókien. Siatkę obliczeniową dobierano tak aby zapewnić generację przynajmniej 10 komórek elementarnych między włóknami.

W drugim przypadku przyjęto skupienie włókien w wiązki wypełniające domenę Ω_2 (Rys. 4.84). W domenie Ω_1 (bez włókien), współczynnik dyfuzji leku wynosił D_{PVA} , zaś w domenie Ω_2 , współczynnik dyfuzji D_i był obliczony na podstawie równania (3.22). Do określenia stopnia zagęszczenia włókien ułożonych w wiązki, wprowadzono parametr S_z , stanowiący stosunek pola kwadratu opisanego na włóknach (ciemnoszare pole domeny Ω_2) do całkowitej powierzchni geometrii (suma jasno i ciemnoszarego pola). Tak opisana struktura z przestrzeniami wolnymi od włókien, występuje dosyć często wewnątrz rzeczywistych materiałów (Rys. 4.82a,b). Współczynniki k_a i k_d uzyskano na podstawie pomiarów uwalniania Rodaminy B z maty PDLG (patrz podrozdział 4.1).

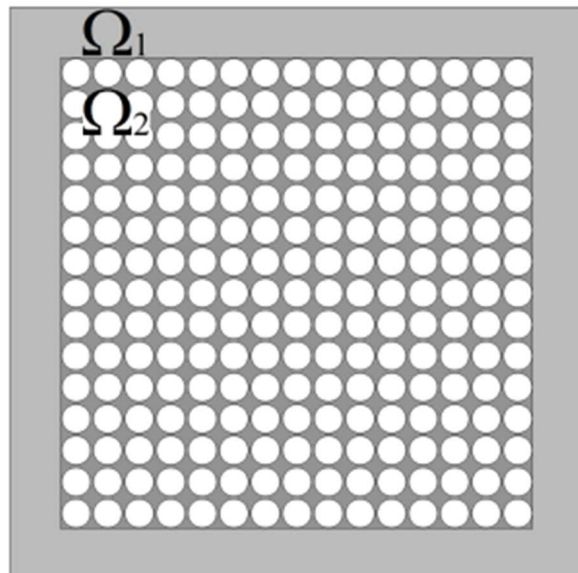
Tab. 4.7. Parametry modelu dla trzech wartości porowatości. Cztery pierwsze parametry stała desorpcji, stała adsorpcji, stężenie początkowe, współczynnik dyfuzji są wspólne dla każdego przypadku. Pozostałe: porowatość, promień włókien, stopień zagęszczenia i obliczony współczynnik dyfuzji dla materiałów $i = 1, 2, 3$ różne w zależności od struktury.

		Współczynnik	Włókna wł. równomiernie	Włókna wł. w wiązkę
		k_d (1/s)	$1 \cdot 10^{-5}$	
		k_a ($m^3/mol \cdot s$)	$1 \cdot 10^{-6}$	
		C_{B0} (kg/kg)	$1,0 \cdot 10^{-3}$	
		D_{PVA} (m^2/s)	$6,3 \cdot 10^{-11}$	
a)	$i = 1$	ε_1 (-)	0,52	
		r_1 (μm)	2,5	
		S_{z1} (-)	1	0,67
		D_1 (m^2/s)	$1,6 \cdot 10^{-11}$	$0,5 \cdot 10^{-11}$
b)	$i = 2$	ε_2 (-)	0,72	
		r_2 (μm)	2	
		S_{z2} (-)	1	0,25
		D_2 (m^2/s)	$3,8 \cdot 10^{-11}$	$1,2 \cdot 10^{-11}$
c)	$i = 3$	ε_3 (-)	0,96	
		r_3 (μm)	1	
		S_{z3} (-)	1	0,04
		D_3 (m^2/s)	$6,3 \cdot 10^{-11}$	$2,7 \cdot 10^{-11}$

a)



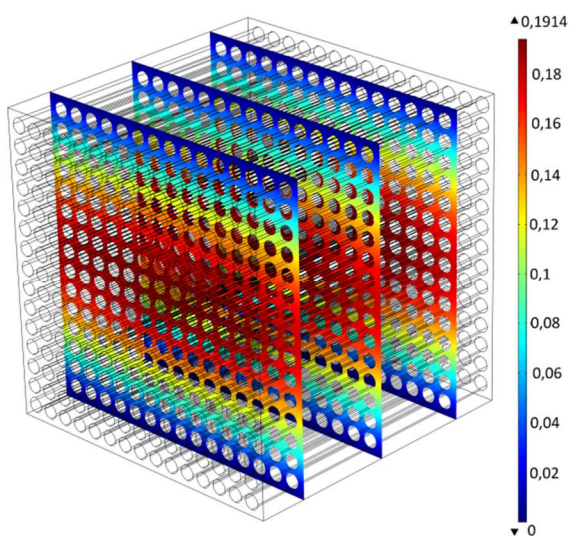
b)



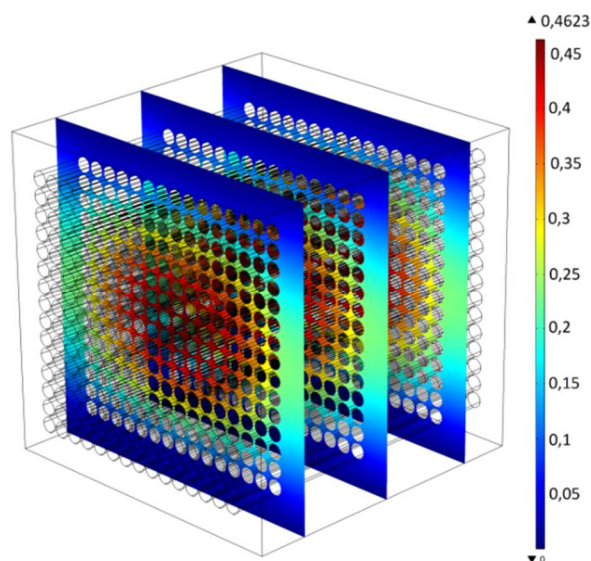
Rys. 4.83. Przekrój poprzeczny domeny dla włókien ułożonych równomiernie, $r_1 = 2,5 \mu m$, $K_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon_1 = 0,52$.

Rys. 4.84. Przekrój poprzeczny domeny dla włókien skupionych w wiązkę $r_1 = 2,5 \mu m$, $K_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon_1 = 0,52$.

Na rysunkach 4.85 i 4.86 przedstawiono rezultaty obliczeń numerycznych stężenia leku w płynie zawartym pomiędzy równomiernie ułożonymi włóknami po 14 dniach od rozpoczęcia uwalniania dla dwóch przypadków o najmniejszej porowatości $\varepsilon_1 = 0,52$ (patrz Tab. 4.5a). W obu symulacjach warunek brzegowy Dirichleta $C_B = 0 \text{ kg/m}^3$ zastosowano na bocznych płaszczyznach (prostopadłe do rysunku). Jak widać na rysunku 4.86 zmniejszenie odległości pomiędzy włóknami hamuje dyfuzyjny transport leku co jest widoczne w domenie w postaci otoczki o zmniejszonym stężeniu substancji.



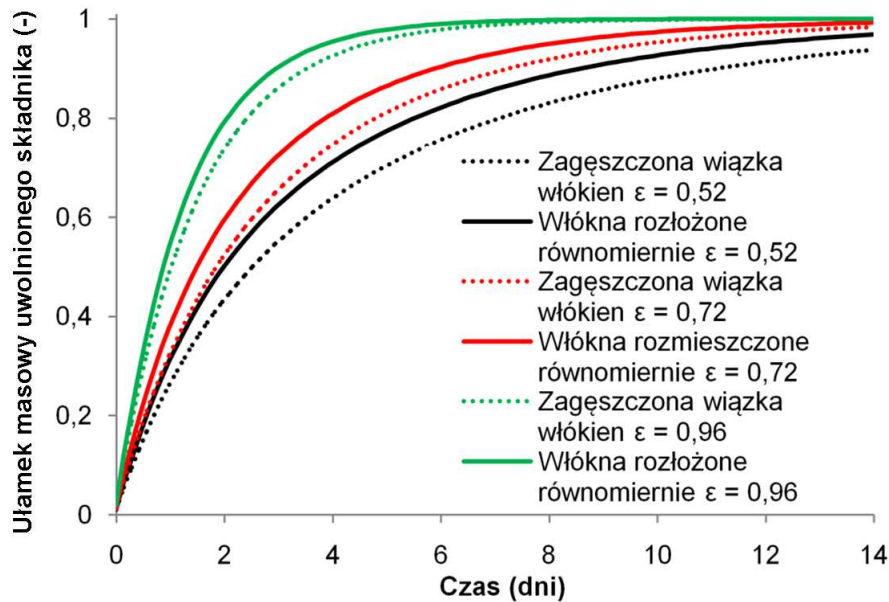
Rys. 4.85. Stężenie leku w płynie pomiędzy równomiernie rozłożonymi włóknami ($\mu\text{g/ml}$); $r_1 = 2,5 \mu\text{m}$, $\mathbf{K}_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon_1 = 0,52$. Skala reprezentuje stężenie składnika ($\mu\text{g/ml}$).



Rys. 4.86. Stężenie leku w płynie pomiędzy włóknami skupionymi w wiązce ($\mu\text{g/ml}$); $r_1 = 2,5 \mu\text{m}$, $\mathbf{K}_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon_1 = 0,52$.

Rysunek 4.87 przedstawia profile szybkości uwalniania leku w zależności od porowatości (Tab.4.7 a-c) dla trzech badanych porowatości i dwóch konfiguracji włókien. Analizując uzyskane wyniki można zauważyć, iż dla maty o najmniejszej porowatości – linie koloru czarnego (Tab. 4.7a), uwalnianie przebiega znacznie wolniej niż w przypadku mat bardziej porowatych np. dla 4 dni różnice sięgają blisko 40% (porównaj kolory czarny i zielony Tab. 4.7b i c). Istotny jest również wpływ zagęszczenia włókien (linia ciągła – włókna rozmieszczone równomiernie, linia przerywana – włókna zagęszczone). Domena o włóknach zagęszczonych w wiązce charakteryzuje się wolniejszym uwalnianiem substancji, zgodnie z tym jak wyjaśniono w poprzednim akapicie. Wraz ze wzrostem porowatości mat różnica w uwalnianiu pomiędzy równomiernie rozłożonymi a zagęszczonymi włóknami maleje, np. dla 14 dnia uwalniania w przypadku geometrii o porowatości $\varepsilon_1 = 0,52$ różnica w ilości uwolnionej substancji wynosi około 3% (różnica

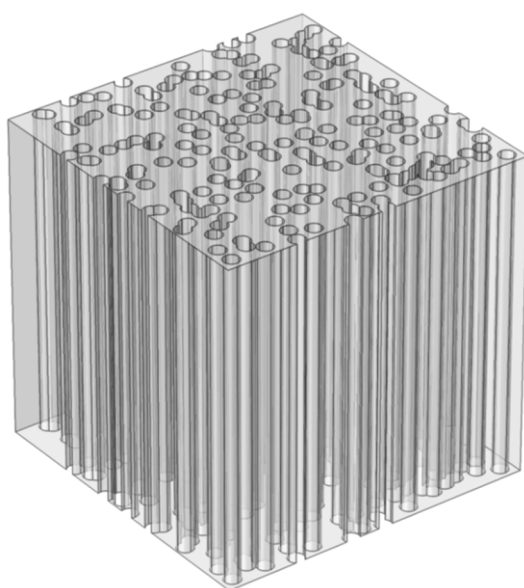
w wysokości czarnej linii ciągłej i przerywanej), zaś dla geometrii o porowatości $\varepsilon_2 = 0,72$, po 14 dniach uwolniona została dokładnie taka sama masa. Wynika z tego możliwość wpływu na profil uwalniania przy zachowaniu tej samej całkowitej ilości uwolnionego w zadanym czasie leku.



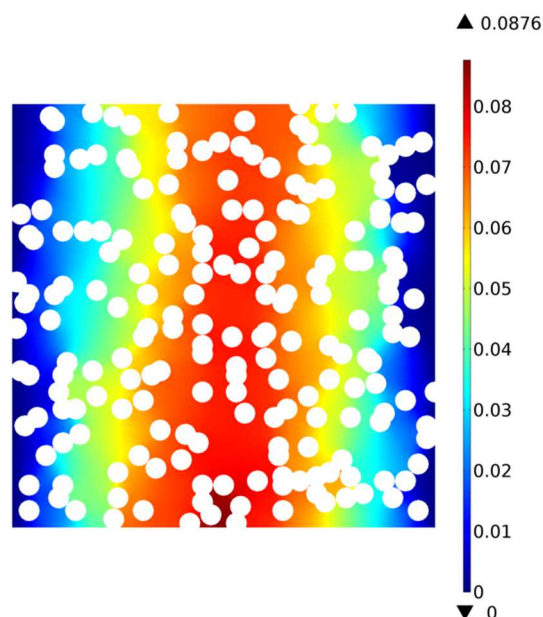
Rys. 4.87. Wpływ porowatości i zagęszczenia włókien na szybkość uwalniania leku.

Wpływ nieregularnego ułożenia włókien w płaszczyźnie XY na proces uwalniania leku

Regularność ułożenia włókien w materiale można w pewnym zakresie regulować w trakcie procesu elektroprzędzenia. Dla porównania wpływu nieregularności włókien na proces uwalniania leku wykonano dwie serie obliczeń: włókna regularnie rozmieszczone i ułożone przypadkowo. Dla dokładniejszego odwzorowania struktury materiału o nieregularnym ułożeniu włókien, włókna umieszczono losowo na płaszczyźnie XY. Zostało wylosowane 225 położenia środków włókien (wartości X i Y losowano z przedziału 0 – 100 μm). Wykorzystanie domeny obliczeniowej z przenikającymi się wzajemnie włóknami, wraz z zastosowaniem warunku brzegowego na powierzchni włókien przedstawionego za pomocą równania (3.9), stanowi dobre przybliżenie dla omawianego problemu. Położenia 225 włókien wylosowano tylko raz i zastosowano we wszystkich trzech geometriach o różnej porowatości (różnym promieniu włókien).

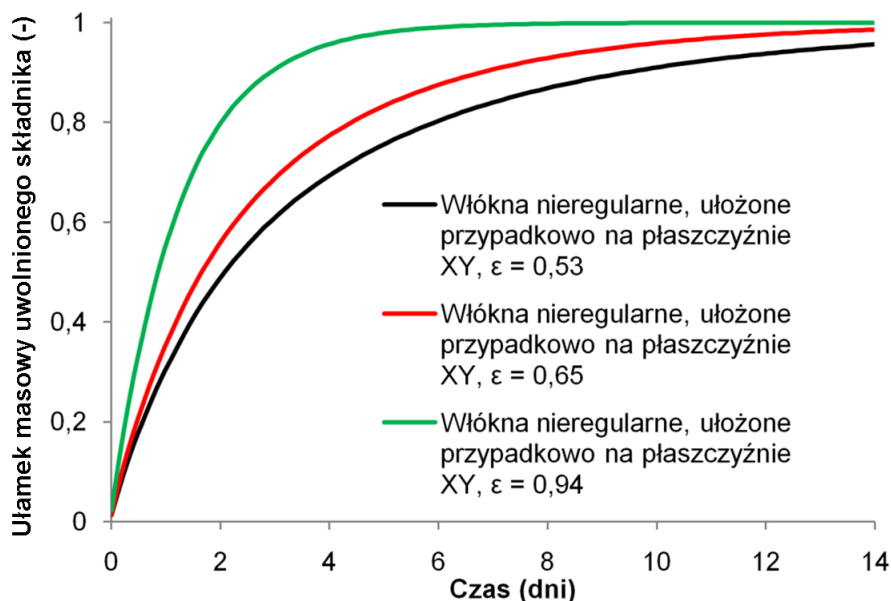


Rys. 4.88. Włókna ułożone przypadkowo w płaszczyźnie XY , idealnie ukierunkowane, $r_1 = 2,5 \mu\text{m}$, $\mathbf{K}_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon = 0,53$.



Rys. 4.89. Obliczone stężenie leku w płynie pomiędzy przypadkowo ułożonymi włóknami po 14 dniach od rozpoczęcia uwalniania w przekroju poprzecznym domeny, $r_1 = 2,5 \mu\text{m}$, $\mathbf{K}_t = [0 \ 0 \ 1]$, $\varepsilon_1 = 0,53$. Skala reprezentuje stężenie składnika ($\mu\text{g/ml}$).

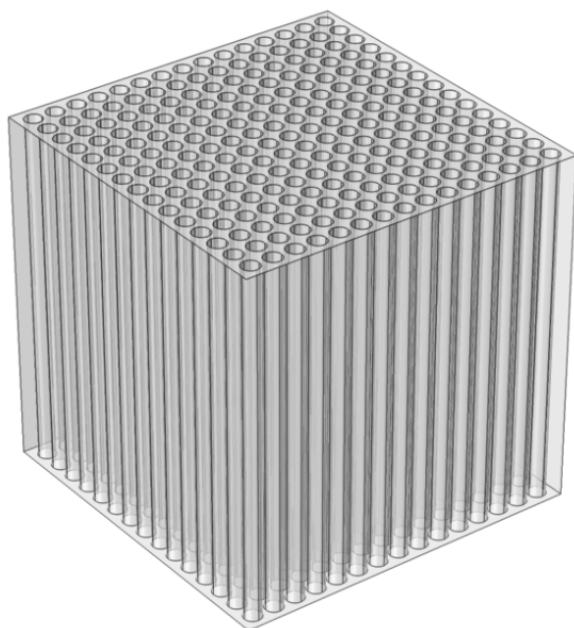
Na rysunku 4.90 zauważalna jest analogiczna zależność profili uwalniania od porowatości jak w przypadku włókien ułożonych równomiernie (Rys. 4.87) z tą różnicą, że w przypadku włókien ułożonych nieregularnie, lokalne zagęszczenia czy też nachodzenie na siebie włókien w mniejszym stopniu wpływa na spowolnienie procesu uwalniania składnika. Generalizując, przebieg profilu uwalniania leku z włókien ułożonych nieregularnie będzie zawierał się pomiędzy dwoma liniami (ciągłą i przerywaną) na rysunku 4.87. (przy takiej samej porowatości wszystkich trzech mat). Analiza obliczeń wskazała dodatkowo, że różnica w całkowitej ilości uwolnionego składnika może wynieść maksymalnie 7 % dla materiału o tej samej porowatości $\varepsilon = 0,53$ i czasu uwalniania 4 dni.



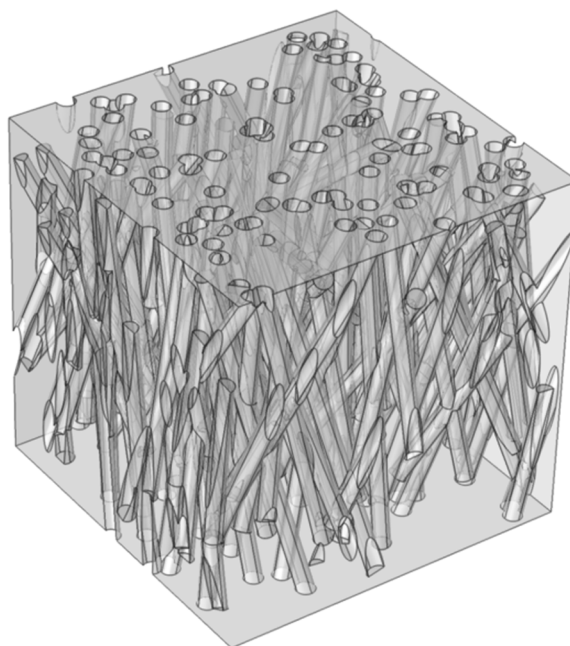
Rys. 4.90. Wpływ porowatości maty dla przypadkowo ułożonych włókien w płaszczyźnie XY na szybkość uwalniania leku.

Wpływ ukierunkowania oraz dyspersji promieni włókien na proces uwalniania leku

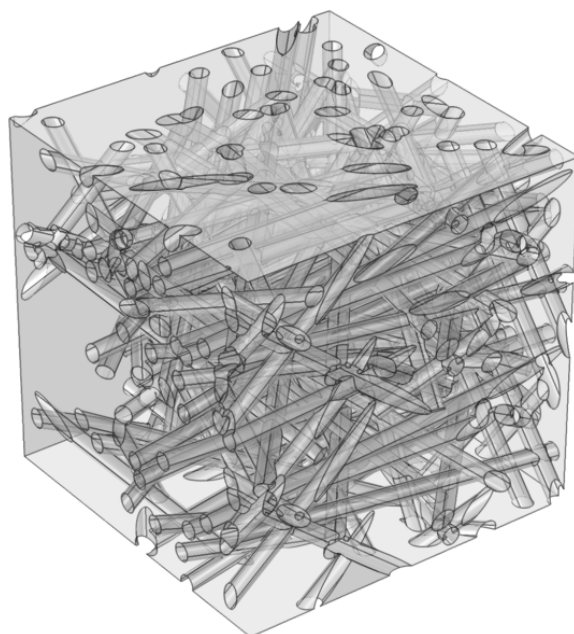
Materiał z jakiego wykonane są maty w procesie elektroprzędzenia charakteryzuje znaczny rozrzut parametrów geometrii ułożenia włókien. Z tego względu następnym krokiem było zbadanie procesów desorpcji – dyfuzji w strukturach o takiej samej porowatości $\varepsilon = 0,72$, różniących się sposobem ułożenia włókien. W tym celu porównano ze sobą cztery geometrie: o włóknach ułożonych regularnie (idealnie ukierunkowanych), włóknach umiarkowanie ukierunkowanych oraz dwie geometrie odwzorowujące materiał izotropowy (tj. bez wyróżnionego głównego kierunku włókien), z których jeden zawierał włókna o średnim promieniu włókien \bar{r} , zaś drugi o promieniach wylosowanych z rozkładu Gaussa. Kierunek i położenie włókien generowane były losowo, zaś orientację włókien w całej geometrii określono na podstawie wzoru (4.5). Dla wyżej wymienionych struktur zastosowano takie same warunki brzegowe jak w podrozdziale 3.3.2 tj. warunek brzegowy Dirichleta stężenia leku w płynie tuż przy ściance wynoszący $C_B = 0 \text{ kg/m}^3$, ustanowiony na ściankach równoległych do głównego kierunku włókien.



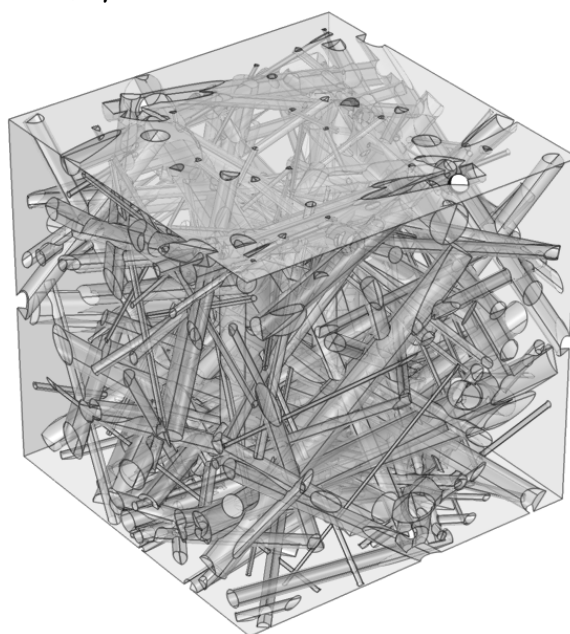
Rys. 4.91. Włókna równomiernie rozłożone, idealnie ukierunkowane, stopień ukierunkowania $\mathbf{K}_t = [0 \ 0 \ 1]$, $r = 2,5 \mu\text{m}$.



Rys. 4.92. Włókna nieregularne, umiarkowanie ukierunkowane, stopień ukierunkowania $\mathbf{K}_t = [0,16 \ 0,14 \ 0,70]$, $r = 2,5 \mu\text{m}$.



Rys. 4.93 Włókna ułożone nieregularnie o jednakowym promieniu, $r = 1,6 \mu\text{m}$. Stopień ukierunkowania $\mathbf{K}_t = [0,39 \ 0,31 \ 0,30]$.



Rys. 4.94. Włókna ułożone nieregularnie, Gaussowski rozkład promieni włókien, $\bar{r} = 1,6 \mu\text{m}$, $\sigma = 0,6 \mu\text{m}$, Stopień ukierunkowania $\mathbf{K}_t = [0,36 \ 0,33 \ 0,31]$.

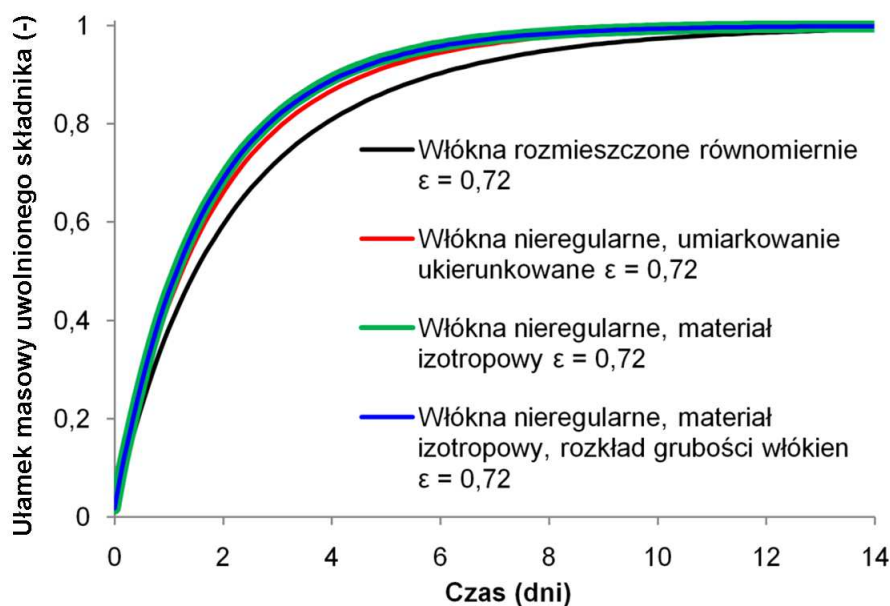
Dla wygenerowania struktury maty z włókien o niejednakowym promieniu na podstawie zdjęć SEM oraz obrazów mikroskopii optycznej, określono średni promień włókien jak również rozkład ich promienia w warunkach typowego eksperymentu (Rys.

4.81b). Średni promień otrzymanych włókien wynosi: $\bar{r} = 1,6 \mu m$, przy odchyleniu standardowym równym $\sigma = 0,6 \mu m$. Następnie korzystając z dopasowania krzywej Gaussa, wygenerowano losowo 225 grubości włókien, które zostały umieszczone w domenie obliczeniowej.

Tab. 4.8. Charakterystyka ukierunkowania włókien w symulacjach numerycznych dla porowatości $\varepsilon = 0,72$

Rodzaj włókien	Stopień ukierunkowania włókien K_t
Włókna równomiernie rozłożone, idealnie ukierunkowane	[0 0 1]
Włókna nieregularne, umiarkowanie ukierunkowane	[0,16 0,14 0,70]
Włókna ułożone nieregularnie o jednakowym promieniu	[0,39 0,31 0,30]
Włókna ułożone nieregularnie, Gaussowski rozkład promieni włókien	[0,36 0,33 0,31]

Na rysunku 4.95 przedstawiono obliczone profile uwalniania leku dla czterech wyżej wymienionych rodzajów ułożenia włókien, w matach o takiej samej porowatości równej $\varepsilon = 0,72$. Po czterech dniach uwalniania, włókna regularne (idealnie ukierunkowane) uwolniły najmniej leku, około 80% początkowej dawki. Stwierdzono nieznaczne przyspieszenie uwalniania w przypadku umiarkowanie ukierunkowanych włókien. Wzrost szybkości uwalniania może być spowodowany wzrostem odległości między włóknami i rozrzutem wielkości porów, przez co zmniejszeniu ulega hamujący wpływ sąsiadujących włókien. Uwalnianie leku w geometrii z niewyróżnionym kierunkiem włókien jest najszybsze dla tego przypadku i nie zauważono różnicy pomiędzy szybkością uwalniania leku z geometrii o włóknach o stałym promieniu i włóknach o promieniu zmieniającym się wg typowego rozkładu Gaussa uzyskanych z pomiarów mat (pokrywanie się linii niebieskiej i zielonej).



Rys. 4.95. Wpływ ukierunkowania i rozkładu promieni włókien na szybkość uwalniania leku

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych symulacji numerycznych stwierdzono możliwość sterowania szybkością i profilem uwalniania poprzez zmianę konfiguracji włókien umieszczonych w materiale maty. Zostało wykazane, że zmniejszenie odległości pomiędzy włóknami doprowadza do spowolnienia uwalniania leku z materiału. Z drugiej strony wzrost porowatości może doprowadzić do wzrostu szybkości uwalniania i w efekcie do wystąpienia niekorzystnego w pewnych przypadkach, zjawiska wyrzutu leku. Słuszne wydaje się zatem wykorzystanie materiału o bardzo ukierunkowanych włóknach tylko na powierzchni zewnętrznej płaskiego materiału w celu spowolnienia uwalniania leku w jednym bądź obu kierunkach. Najszybsze uwalnianie leku osiągnięto w geometrii o włóknach nieukierunkowanych przy jednoczesnym zaobserwowaniu braku różnic pomiędzy szybkościami uwalniania leku z maty złożonej z włókien o jednakowej średnicy a analogicznej maty z włókien o promieniach wylosowanych wg rozkładu Gaussa. Można zatem przypuszczać, że występująca w typowych eksperymentach dyspersja promieni włókien ma stosunkowo niewielki wpływ na efektywną wartość dyfuzji leku. Upoważnia to do stosowania uśrednionych, efektywnych wartości otrzymanych na podstawie pomiarów mikroskopowych.

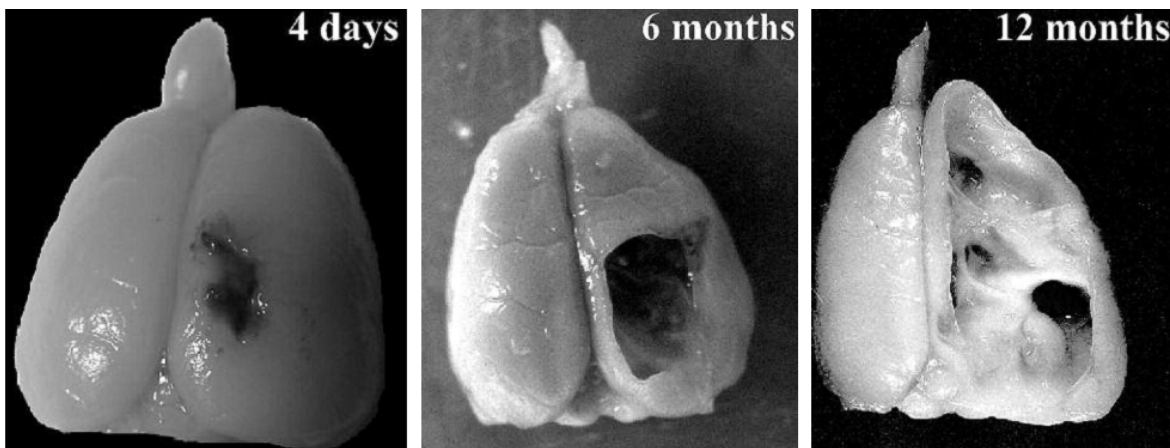
Zastosowanie elektroprzędzonych nanowłókien jako opatrunków w urazach tkanki nerwowej

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie opieką nad chorymi we wczesnej fazie urazu tkanki nerwowej między innymi przy zapobieganiu pourazowym zmianom w mózgu, tzw. wtórnym uszkodzeniu funkcji mózgu. Zmiany te polegają na mechanicznym uszkodzeniu tkanki nerwowej i naczyń krwionośnych, które w konsekwencji powodują powikłania związane z uciskiem mózgu, takie jak: krwiaki (podtwardówkowy, nadtwardówkowy, wewnątrzmożgowy), wodniak podtwardówkowy, pourazowy obrzęk mózgu, krwotok podpajęczynówkowy i pourazowe tętniaki mózgu. Wczesne rozpoznanie wraz z neurochirurgicznymi operacjami usunięcia krwioaków wykrytych podczas monitorowania klinicznego w pierwszych dobach po przyjęciu chorego do szpitala pozwala potencjalnie zapobiec skutkom wtórnego uszkodzenia mózgu.

Operacje neurochirurgiczne z zasady powinny być minimalnie inwazyjne, jednakże mogą być one również powodem niezamierzonych zmian w mózgu, kończących się neurodegeneracją i atrofią mózgu. Jedną z konsekwencji urazów mechanicznych lub operacyjnych uszkodzeń mózgu jest bowiem tworzenie blizny glejowej. Proces nieprawidłowego bliznowacenia tkanki nerwowej utrudnia prawidłowe gojenie oraz funkcjonowanie mózgu. Istnieje niewystarczająca ilość danych klinicznych dotyczących procedur zapobiegających bliznowaceniu w obrębie mózgowia. Nie są obecnie stosowane rutynowo żadne materiały zabezpieczające przed blizną w obrębie mózgowia, zaś stosowane

materiały uszczelniające czy hemostatyczne np. Tachocomb® czy Oxycel® powstałe na bazie kolagenu zwierzęcego mogą wywoływać miejscową reakcję na obce białko i odczyn zapalny wokół ciała obcego [158], [159].

Analizowany w niniejszej pracy materiał z nanowłókien został zastosowany w zapobieganiu bliznowaceniu w zabiegach neurochirurgicznych rdzenia kręgowego [150] i mózgu [151]. Wskazano na korzystny wpływ nanowłókien na zmniejszenie wielkości blizny i zwłóknienia zewnątrzoponowego tworzących się po zabiegach neurochirurgicznych. W celu skutecznej profilaktyki oraz zahamowania tworzenia nieprawidłowej blizny tkanki mózgowej, neurodegeneracji i śmierci komórek nerwowych rozpoczęto badania nad zastosowaniem aktywnych opatrunków bazujących na biokompatybilnych nanowłóknach. Dodatkowym czynnikiem wspomagającym neuroprotekcję jest zastosowanie substancji aktywnych takich jak alfa-tokoferol, który eliminuje wolne rodniki, jak również czynniki wzrostu neuronów (*Nerve Growth Factor – NGF*, *Brain Derived Neurotrophic Factor - BDNF*). Badania nad wprowadzeniem leków do elektroprzędzonych nanowłókien miały na celu uzyskanie stopniowego uwalniania ich w okresie 10-21 dni; w okresie ważnym z terapeutycznego punktu widzenia przebudowy kory mózgowej w mózgu szczura (model niekliniczny).



Rys. 5.1. Widok na rozrost uszkodzenia mózgu szczura, po chirurgicznym urazie mózgu bez nałożonego opatrunku z nanowłókien [106].

Zastosowane opatrunki tkanki nerwowej

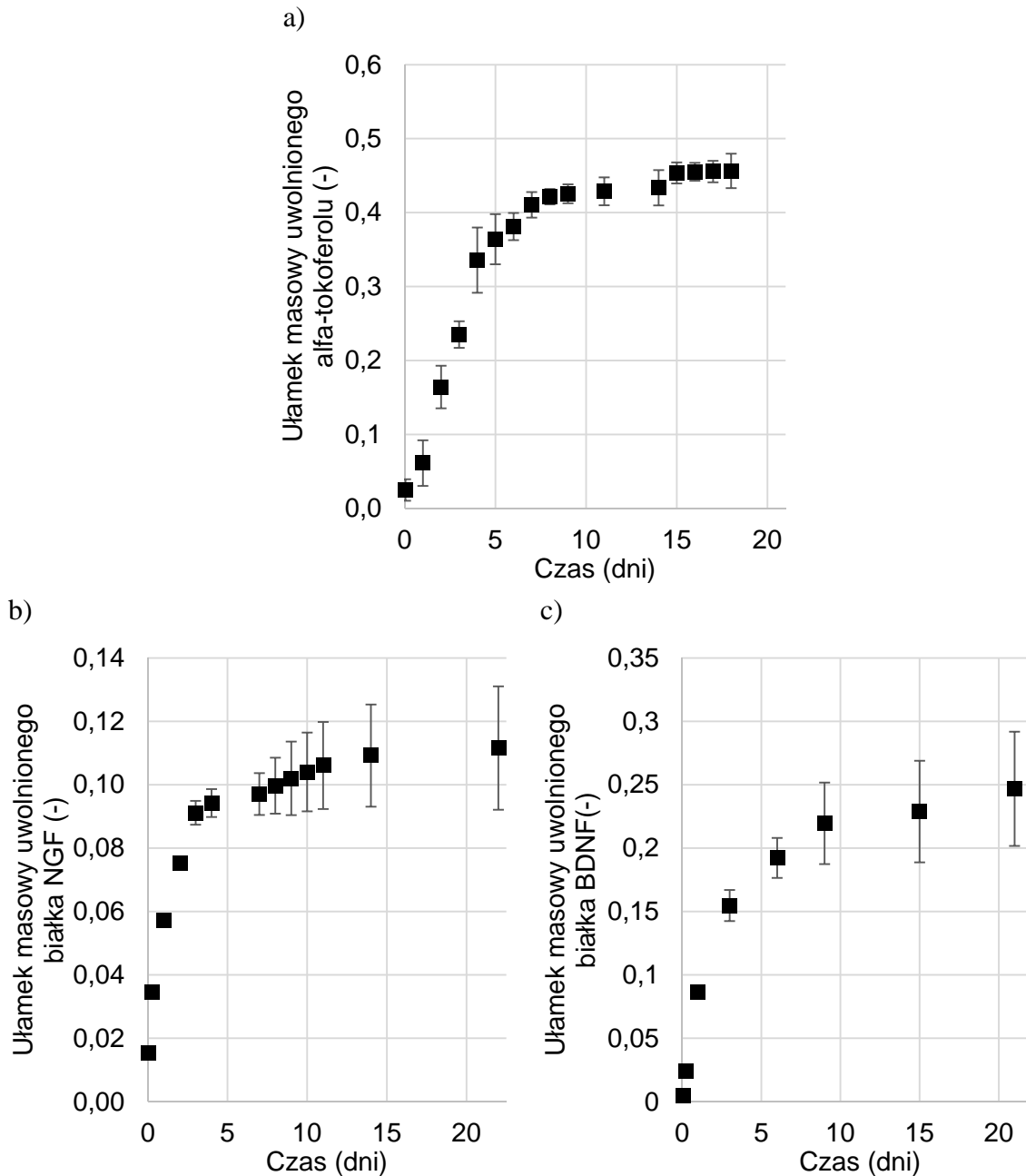
Tworzenie porowatej struktury zbudowanej z odpowiednio ukierunkowanych włókien metodą przędzenia elektrostatycznego wraz z charakterystyką materiałów wykorzystanych do tworzenia opatrunków zostało przedstawione w poprzednich rozdziałach. Jak już wspomniano w podrozdziałach 4.1.1.2 i 4.1.2.2. do celów doświadczalnych na szczurzym modelu zwierzęcym z chirurgicznym uszkodzeniem kory

mózgowej zdecydowano się wykorzystać poli(L-Laktyd-*co*-kaprolakton). Materiał ten posiada dopuszczenia medyczne do systemów uwalniania leków i protez. Materiał rozpuszczono w mieszaninie chloroform dimetyloformamid, dlatego po procesie elektroprzędzenia, każdy z materiałów umieszczano na okres dwóch do trzech tygodni w atmosferze ochronnej w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika.

Tab. 5.1. Zestawienie badanych materiałów zastosowanych w modelu zwierzęcym uszkodzenia mózgu.

Nr materiału	Lek	Zawartość leku wzg. polimeru (% wag.)	Zawartość leku ($\mu\text{g} /$ cm^2 maty)	Grubość włókien (μm)
MT1	alfa-tokoferol	5	250	$0,20 \pm 0,07$
MN4	NGF	$1 \cdot 10^{-4}$	0,01	$0,86 \pm 0,20$
MB1	BDNF	$1 \cdot 10^{-4}$	0,01	$1,28 \pm 0,40$

Przygotowane siatki (Tab. 5.1) poddane zostały kontroli jakości z zastosowaniem mikroskopu elektronowego. Gotowa siatka była cięta na fragmenty o wymiarach ok. $3 \times 3 \text{ mm}^2$, które umieszczano w torebkach do sterylizacji, a następnie poddawano standardowej procedurze sterylizacji w atmosferze tlenku etylenu. Optymalizacja metod wytwarzania elektroprzędzonych nanowłókien do zastosowania jako opatrunki aktywne zawierające neuroprotektoryjne substancje ochronne (alfa-tokoferol, białkowe czynniki neurotroficzne: NGF i BDNF) zostały opracowane jako pierwszy etap przeprowadzonych badań (podrozdziały 4.1.1.2 i 4.1.2.2.).



Rys. 5.2. Spodziewane profile uwalniania leków do tkanki mózgowej. a) alfa-tokoferol (MT1), b) czynnik wzrostu NGF (MN4), c) czynnik wzrostu BDNF (MB1).

Model eksperymentalny chirurgicznego uszkodzenia mózgu

Ocena możliwości wykorzystania materiałów z nanowłókien (Tab. 5.1) jako systemów uwalniania leków została przeprowadzona przez współpracujący Zespół w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Zgodnie z zatwierdzonym modelem eksperymentalnym przeprowadzono tam badania na szczurzym modelu chirurgicznego uszkodzenia mózgu. Prześladowano i zanalizowano mechanizmy naprawy i przebudowy kory mózgowej po chirurgicznym uszkodzeniu mózgu.

W każdej z grup zwierząt pobierano próbki tkanki mózgowej od zwierząt po czasie przeżycia wynoszącym odpowiednio: 4, 7, 14, 30 i 60 dni. Wśród zwierząt objętych badaniami doświadczalnymi wydzielono grupę kontrolną, która nie została zoperowana. Kolejną grupę zwierząt doświadczalnych objęto operacją pozorowaną (tzw. sham), podczas której wykonywano zabieg kraniotomii polegający na wykonaniu dostępu do kory mózgowej, a następnie zaszyciu opon mózgowych i skóry głowy. Następną grupę doświadczalną stanowiły zwierzęta poddane operacji chirurgicznej, podczas której zastosowano biodegradowalne maty z nanowłókien na powierzchnię nieuszkodzonej kory mózgowej. Dwie kolejne grupy zwierząt doświadczalnych poddano operacji wraz z chirurgicznym urazem okolicy czołowo-skroniowej kory mózgowej. Uraz ten polegał na usunięciu kości i opony twardej a następnie nacięciu kory mózgowej o wielkości ok. 1 x 1 x 1 mm. Po wykonaniu chirurgicznego uszkodzenia kory mózgowej, na jednej z grup zastosowano biodegradowalny materiał z nanowłókien na powierzchnię rany pooperacyjnej, zaś na drugiej grupie nie zastosowano żadnego opatrunku. Ponadto, zwierzęta u których założono opatrunki z nanowłókien, zostały podzielone losowo na cztery grupy, w których materiał pełnił funkcję: opatrunku, opatrunku aktywnego uwalniającego alfa-tokoferol, opatrunku aktywnego uwalniającego czynnik troficzny wzrostu nerwów NGF, bądź opatrunku aktywnego uwalniającego czynnik troficzny pochodzenia mózgowego BDNF. W sumie dla każdego z czterech typów opatrunków, dwóch grup zwierząt objętych inną procedurą chirurgiczną (grupa kontrolna bez urazu, z urazem oraz grupa „sham” wykonane były tylko raz), pięciu czasów przeżycia i szczęściu szczurów na każdy z czasów przeżycia w ramach projektu zoperowano 330 szczurów.

Metoda oceny uszkodzenia

Do przeprowadzenia oceny uszkodzenia i wywołanej nim odpowiedzi komórkowej (komórek nerwowych, glejowych i śródbłonkowych) po urazie chirurgicznym kory mózgowej oraz po zastosowaniu biodegradowalnych opatrunków z nanowłókien wykorzystano techniki immunohistochemiczne. Dodatkowo przeprowadzono ocenę odpowiedzi zapalnej na obecność elektroprzędzonego materiału.

Wyniki badań na modelu zwierzęcym

W materiale tkankowym pozyskanym ze zwierząt kontrolnych nieoperowanych obserwowano prawidłową budowę morfologiczną wszystkich elementów złącza nerwowo-naczyniowego (Rys. 5.3A). Nie wykryto żadnych zmian degeneracyjnych dotyczących

komórek parenchymy mózgowej. Podobne wyniki uzyskano dla materiału pochodzącego od zwierząt poddanych operacji pozorowanej (sham) [151], [160].

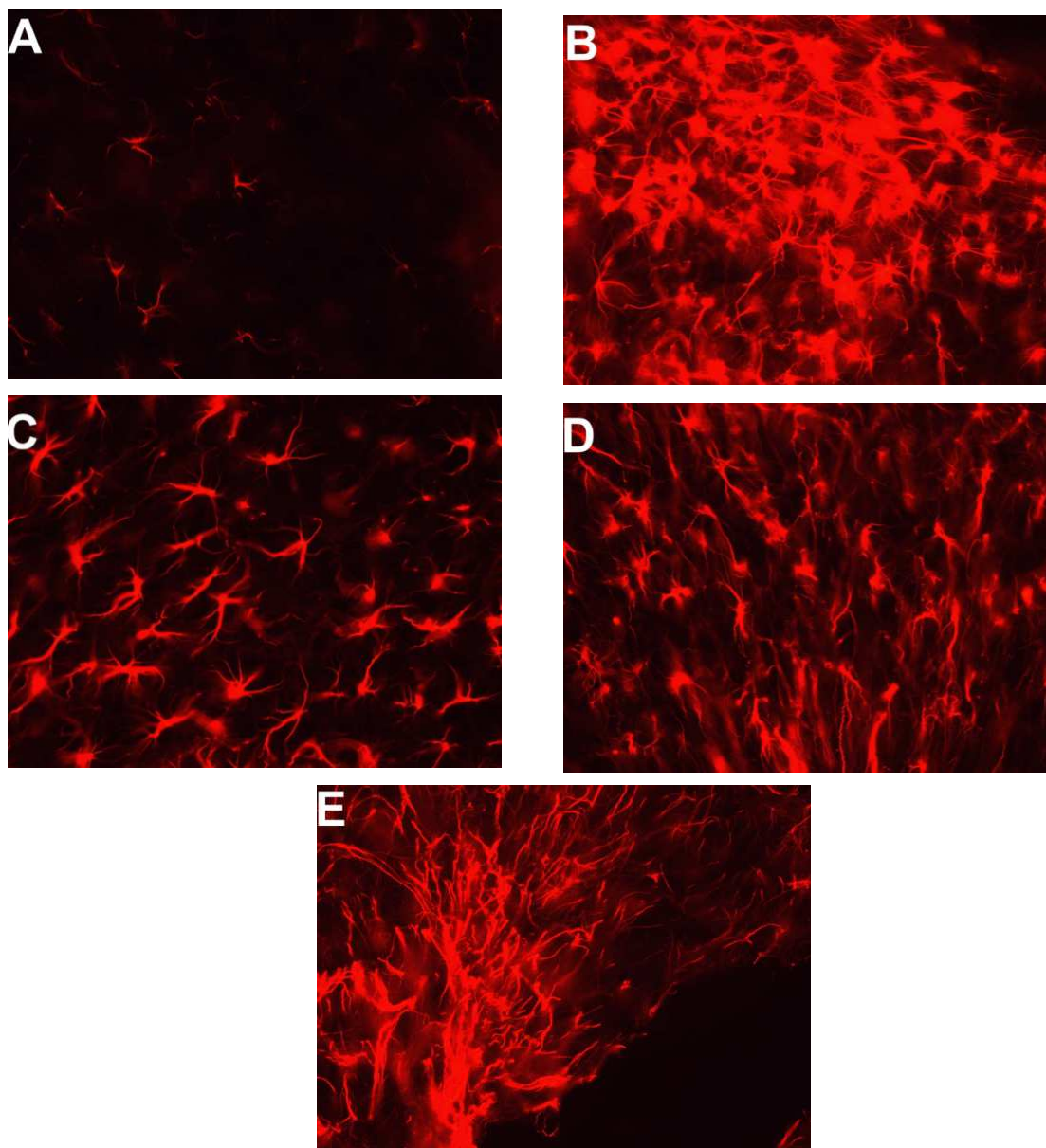
Analiza materiału pobranego od zwierząt z opatrunkiem zastosowanym na nieuszkodzoną powierzchnię kory mózgowej wykazała, że opatrunek nie wywołuje zmian w badanych strukturach. Nie obserwowano śmierci komórek kory mózgowej ani objawów reakcji zapalnej ze strony ośrodkowego układu nerwowego (brak makrofagów oraz aktywacji mikro- i astrogleju). Wyniki barwienia neuronów i astrocytów wskazują, że materiał cechuje biokompatybilność z tkanką umieszczoną w żywym organizmie [151], [160].

W grupie zwierząt poddanych operacji neurochirurgicznej zaobserwowano masywną neurodegenerację i śmierć komórek nerwowych oraz astrogleju, najsilniejszą w okresie od 4 do 14 dni po operacji (Rys. 5.3B). Już we wczesnych punktach czasowych rejestrowano masywny napływ makrofagów [151], [160].

Analiza materiału pozyskanego ze zwierząt z urazem zaopatrzonym opatrunkiem z nanowłókien wykazała brak zmian zapalnych we wszystkich badanych punktach czasowych, w przeciwieństwie do obserwacji poczynionych w grupie zwierząt z urazem (Rys. 5.3C-E).

Powyższe wyniki wskazują, że opatrunek posiada właściwości zapobiegające procesowi bliznowacenia. Dodatkowo, materiały z nanowłókien hamowały krwawienie po wykonanym zabiegu chirurgicznym. Otrzymane wyniki wskazują, że zastosowany materiał cechuje nie tylko biokompatybilność z tkanką nerwową ale również działanie hemostatyczne.

W przypadku materiałów wykorzystanych jako opatrunki aktywne na korę mózgową szczura, zastosowanie aktywnych opatrunków z alfa-tokoferolem, NGF i BDNF na nieuszkodzoną korę mózgową nie wywołało reakcji zapalnej ani śmierci komórek mikro- i astrogleju. Analiza materiału pozyskanego od zwierząt z uszkodzeniem tkanki nerwowej zaopatrzonej opatrunkami zawierającymi wymienione substancje aktywne, nie wykazała wpływu uwalnianych czynników na stan tkanki nerwowej. Elementy złącza nerwowo-naczyniowego posiadały cechy występujące w grupie zwierząt poddanych operacji i zaopatrzonych materiałem niezawierającym czynników neuroprotektoryjnych. W zbadanych krokach czasowych nie stwierdzono dodatkowego wpływu uwalnianego leku na regenerację tkanki nerwowej. Nie można wykluczyć, że wpływ ten będzie widoczny dla dużo dłuższych okresów czasowych.



Rys. 5.3. Blizna glejowa po urazie mózgu. Znakowanie na obecność GFAP (kwaśnego białka włóknikowego). A) grupa kontrolna, B) 4 dni po operacji – rana nieopatrzona, C) 4 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem, D) 14 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem, E) 30 dni po operacji – rana opatrzona nanomateriałem [151].

Uzyskane wyniki sugerują ochronne działanie samego materiału z nanowłókien. Przepuszczalna struktura przestrzenna zastosowanych opatrunków, imitująca strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej kolagenu, może promować prawidłowe gojenie i ograniczanie obszaru powstającej blizny.

Podsumowanie

Zastosowanie materiałów w postaci opatrunków w obrębie urazu ośrodkowego układu nerwowego może być w przyszłości wykorzystane jako skuteczna forma terapii. Po

przeprowadzeniu w przyszłości udanych badań przedklinicznych na pacjentach materiał będzie mógł znaleźć zastosowanie kliniczne podczas operacji neurologicznych.

Zastosowanie materiałów z nanowłókien polimerowych jako aktywnego opatrunku zapobiegającego tworzeniu się patologicznym zmianom w tkance mózgowej zostało zgłoszone do ochrony patentowej (P404667) a także jest przedmiotem publikacji naukowych dotyczących systemów uwalniania leków oraz w neurologii [125], [151], [160], [161].

6. Podsumowanie wyników badań

Na podstawie przeprowadzonych symulacji numerycznych modelu mikroskopowego stwierdzono możliwość sterowania szybkością i profilem uwalniania poprzez zmianę konfiguracji włókien umieszczonych w materiale maty. Zostało wykazane, że zmniejszenie odległości pomiędzy włóknami i zwiększenie regularności struktury doprowadza do spowolnienia uwalniania leku z materiału. Z drugiej strony wzrost porowatości może doprowadzić do wzrostu szybkości uwalniania i w efekcie do wystąpienia niekorzystnego zjawiska początkowego wyrzutu leku. Wyniki symulacji numerycznych modelu mikroskopowego dostarczyły informacji o polu stężenia dla różnych parametrów materiałowych takich jak: stężenie początkowe leku w materiale, porowatość lub grubość nanowłókien w materiale.

Informacja o stężeniu w funkcji odległości od implantu w modelu makroskopowym, pozwala określić skuteczność terapii poprzez np. stwierdzenie stężeń powyżej granicy toksyczności lub wartości poniżej minimalnego stężenia terapeutycznego. Przeprowadzone badania wykazują, że metoda ewaluacji uwalniania leków, wykorzystująca ośrodek hydrożelowy sprzężony z nożem świetlnym wzbudzającym analog leku (czynnik fluorescencyjny), pozwala na uzyskanie dokładnych danych czasoprzestrzennych stężenia substancji uwalnianej z materiału. Porównanie przedstawionej metody fluorescencyjnej z metodą absorpcyjną innych autorów wskazuje na lepszą dokładność opisanej w niniejszej pracy metody bezpośredniego wyznaczania stężenia.

Stwierdzono iż stopniowe uwalnianie alfa-tokoferolu według otrzymanych profili może przyczynić się do korzystnej odbudowy tkanki nerwowej po uszkodzeniu neurochirurgicznym. Uwolnienie około połowy dawki leku zawartego w materiale przez okres 23 dni i stopniowe wyhamowanie uwalniania zapewnią stałe dostarczanie największej dawki leku w momencie uszkodzenia mózgu oraz zapewniają dawkę podtrzymującą przez wiele miesięcy od implantacji materiału. Jednocześnie wykazano iż zwiększenie zawartości leku w nanowłóknach prowadzi do przyspieszenia uwalniania leku z uwagi na zwiększoną siłę napędową procesu. Przeprowadzone badania powtarzalności elektroprzędzenia oraz aktywności posterylizacyjnej wykazały zachowanie należytych parametrów materiału niezbędnych do neuroprotekcji tkanki nerwowej.

Uwolnienie czynników neuroprotekcyjnych w ilości około 8% NGF i 23% BDNF początkowej ilości zawartej w materiale przez okres 21 dni zapewni terapeutyczne stężenie

leku w obrębie uszkodzonej tkanki przez wiele miesięcy od implantacji materiału. W ramach badań wykazano iż zastosowanie włókien typu rdzeń – osnowa, zawierających dodatkowo glicerynę jako czynnik osłaniający uwalniane białka jak również zwiększający lepkość rdzenia nanowłókna, może znacząco spowolnić proces uwalniania leków.

Zastosowane opatrunki z lekami i bez leku potwierdziły pozytywny wpływ nanowłókien na proces gojenia tkanki nerwowej zapobiegając jej dalszemu bliznowaceniu. Zastosowanie materiałów w postaci opatrunków w obrębie urazu ośrodkowego układu nerwowego może być w przyszłości wykorzystane jako skuteczna forma terapii urazów ośrodkowego układu nerwowego.

7. Bibliografia

- [1] R. A. Halberstein, "Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns.," *Ann. Epidemiol.*, vol. 15, no. 9, pp. 686–99, 2005.
- [2] M. J. Brownstein, "Review A brief history of opiates, opioid peptides , and opioid receptors," vol. 90, pp. 5391–5393, 1993.
- [3] T. Ciach, "Podstawy Farmakologii - wstęp do rozprawy habilitacyjnej.," Politechnika Warszawska, 2005.
- [4] A. T. Florence, "Controlled Release in Oral Drug Delivery," C.G Wilson, P.J. Crowley, *Advnces in Delivery and Technology*, 2011.
- [5] R. Deanesly, A. S. Parkes, "Further experiments on the administration of hormones by the subcutaneous implantation of tablets.," *Lancet*, vol. 232, no. 6002, pp. 606–609, 1938.
- [6] J. Folkman, D. M. Long, "The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy.," *J. Surg. Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 139–142, 1964.
- [7] "FDA Approved Drug Products - Ocusert Pilo (NDA) Nr017431." Dostępne on-line dnia 15.01.2014: www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Label_ApprovalHistory#apphist.
- [8] A. S. Hoffman, "The origins and evolution of 'controlled' drug delivery systems.," *J. Control. Release*, vol. 132, no. 3, pp. 153–63, 2008.
- [9] R. Langer, J. Folkman, "Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules," *Nature*, vol. 263, no. 5580, pp. 797–800, 1976.
- [10] M. Sokolsky-Papkov, K. Agashi, A. Olaye, K. Shakesheff, A. J. Domb, "Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 4–5, pp. 187–206, 2007.
- [11] O. Pillai, R. Panchagnula, "Polymers in drug delivery," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 5, pp. 447–451, 2001.
- [12] W. Saltzman, "Drug delivery: Engineering principles for drug therapy", Oxford University Press, New York, 2001.
- [13] S. R. Hwang, K. Kim, "Nano-enabled delivery systems across the blood-brain barrier.," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 37, no. 1, pp. 24–30, 2014.
- [14] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, a R. Kulkarni, W. E. Rudzinski, "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices.," *J. Control. Release*, vol. 70, no. 1–2, pp. 1–20, 2001.
- [15] M. Arruebo, M. Valladares, Á. González-Fernández, "Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications," *J. Nanomater.*, vol. 2009, pp. 1–24, 2009.
- [16] E. Mathiowitz, "Drug delivery systems.," *Toxicol. Pathol.*, vol. 36, no. 1, pp. 16–20, Jan. 2008.
- [17] M. Tunçay, S. Caliş, H. S. Kaş, M. T. Ercan, I. Peksoy, A.A Hincal, "In vitro and in vivo evaluation of diclofenac sodium loaded albumin microspheres.," *J. Microencapsul.*, vol. 17, no. 2, pp. 145–55, 2000.
- [18] E. Azizi, A. Namazi, I. Haririan, S. Fouladdel, M. R. Khoshayand, P. Y. Shotorbani, A. Nomani, T. Gazori, "Release profile and stability evaluation of optimized chitosan/alginate nanoparticles as EGFR antisense vector.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 5, pp. 455–61, 2010.

- [19] R. M. Mainardes, R. C. Evangelista, "PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution.," *Int. J. Pharm.*, vol. 290, no. 1–2, pp. 137–44, 2005.
- [20] A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz, H. Car, "Nanoparticles as drug delivery systems.," *Pharmacol. Rep.*, vol. 64, no. 5, pp. 1020–37, 2012.
- [21] M. L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, "Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1, no. 3, pp. 297–315, 2006.
- [22] L. S. S. Guo, R. L. Hamilton, J. Goerke, J. N. Weinstein, and R. J. Havel, "Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoproteins and apolipoproteins.," *J. Lipid Res.*, vol. 21, no. 8, pp. 993–1003, 1980.
- [23] Y. Qiu and K. Park, "Environment-sensitive hydrogels for drug delivery.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 53, no. 3, pp. 321–39, 2001.
- [24] M. Źochowska, A. Paca, G. Schoehn, J.-P. Andrieu, J. Chroboczek, B. Dublet, E. Szolajska, "Adenovirus dodecahedron, as a drug delivery vector.," *PLoS One*, vol. 4, no. 5, p. 5569, 2009.
- [25] H. S. Yoo, T. G. Kim, and T. G. Park, "Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 12, pp. 1033–42, 2009.
- [26] A. Odysseos, "Coaxial nanofibers with tunable release properties as drug delivery and tissue engineering platforms," *EuroNanoForum*, Budapszt, 30 maja, 2011.
- [27] X.M. Wu, C. J. Branford-white, D.-G. Yu, N. P. Chatterton, and L. Zhu, "Preparation of core-shell PAN nanofibers encapsulated α -tocopherol acetate and ascorbic acid 2-phosphate for photoprotection.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 82, no. 1, pp. 247–52, 2011.
- [28] S. Khansari, S. Duzyer, S. Sinha-Ray, A. Hockenberger, A.L. Yarin, B. Pourdeyhimi, "Two-Stage Desorption-Controlled Release of Fluorescent Dye and Vitamin from Solution-Blown and Electrospun Nanofiber Mats Containing Porogens," *Mol. Pharmaceut.* vol. 10, pp. 4509–4526, 2013.
- [29] N. Tucker, J. Stanger, "The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995.," *J. Eng. Fibers Fabr. Special Issue*, 2012.
- [30] W. Gilbert, *On the loadstone and magnetic bodies, and on the great magnet the earth. A new physiology, demonstrated with many arguments and experiments.* Tłumaczenie P. Fleury Motellay 1893. London: London Bernard Quaritch, 1600, p. 432.
- [31] A. Formhals, "Process and apparatus for preparing artificial threads," US19755041934.
- [32] S. N. Reznik, A. L. Yarin, A. Theron, E. Zussman, "Transient and steady shapes of droplets attached to a surface in a strong electric field," *J. Fluid Mech.*, vol. 516, pp. 349–377, 2004.
- [33] S. N. Reznik, a. L. Yarin, E. Zussman, L. Bercovici, "Evolution of a compound droplet attached to a core-shell nozzle under the action of a strong electric field," *Phys. Fluids*, vol. 18, no. 6, p. 062101, 2006.
- [34] S. A. Theron, E. Zussman, A. L. Yarin, "Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions," *Polymer (Guildf.)*, vol. 45, no. 6, pp. 2017–2030, 2004.

-
- [35] P. Nakielski, "Wyszukiwarka informacji naukowych; wynik po wpisaniu frazy nanofibers AND electrospinning," 2014. Dostęp on-line 5 stycznia: www.scirus.com.
- [36] T. A. Kowalewski, S. Barral, "Experiments and modelling of electrospinning process," vol. 53, no. 4, pp. 385–394, 2005.
- [37] G. Taylor, "Disintegration of water drops in an electric field," *Proc. R. Soc.* 1964.
- [38] H. Fong, I. Chun, D. Reneker, "Beaded nanofibers formed during electrospinning," *Polymer (Guildf.)*, vol. 40, no. 16, pp. 4585–4592, 1999.
- [39] J. Doshi, D. Reneker, "Electrospinning process and applications of electrospun fibers," *J. Electrostat.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 151–160, 1995.
- [40] T. Kowalewski, "On separation of droplets from liquid jet," *Fluid Dyn. Res.*, vol. 17, no. 121–145, 1996.
- [41] F. Innocente, D. Mandracchia, E. Pektok, B. Nottelet, J.-C. Tille, S. de Valence, G. Faggian, A. Mazzucco, A. Kalangos, R. Gurny, M. Moeller, B. H. Walpoth, "Paclitaxel-eluting biodegradable synthetic vascular prostheses: a step towards reduction of neointima formation?," *Circulation*, vol. 120, no. 11 Suppl, pp. S37–45, 2009.
- [42] H. Jiang, D. Fang, B. Hsiao, B. Chu, W. Chen, "Preparation and characterization of ibuprofen-loaded poly(lactide-co-glycolide)/poly(ethylene glycol)-g-chitosan electrospun membranes," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 15, no. 3, pp. 279–296, 2004.
- [43] J. Zeng, X. Xu, X. Chen, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, X. Jing, "Biodegradable electrospun fibers for drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 92, no. 3, pp. 227–231, 2003.
- [44] J. Zeng, L. Yang, Q. Liang, X. Zhang, H. Guan, X. Xu, X. Chen, X. Jing, "Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation," *J. Control. Release*, vol. 105, no. 1–2, pp. 43–51, 2005.
- [45] S. H. Ranganath, C.-H. Wang, "Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma," *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2996–3003, 2008.
- [46] E.-R. Kenawy, F. I. Abdel-Hay, M. H. El-Newehy, G. E. Wnek, F. Abdelhay, M. Elnewehy, "Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 113, no. 1, pp. 296–302, 2009.
- [47] G. Buschle-Diller, J. Cooper, Z. Xie, Y. Wu, J. Waldrup, X. Ren, "Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers," *Cellulose*, vol. 14, no. 6, pp. 553–562, 2007.
- [48] Y. Su, Q. Su, W. Liu, G. Jin, X. Mo, S. Ramakrishna, "Dual-drug encapsulation and release from core-shell nanofibers," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 23, pp. 861–871, 2011.
- [49] R. Srikar, A. L. Yarin, C. M. Megaridis, A. V. Bazilevsky, E. Kelley, "Desorption-limited mechanism of release from polymer nanofibers," *Langmuir*, vol. 24, no. 3, pp. 965–74, 2008.
- [50] C. Wang, K.W. Yan, Y.D. Lin, P. C. H. Hsieh, "Biodegradable core/shell fibers by coaxial electrospinning: processing, fiber characterization, and its application in sustained drug release," *Macromolecules*, vol. 43, no. 15, pp. 6389–6397, 2010.

- [51] D. Han, A. J. Steckl, "Triaxial Electrospun Nano fiber Membranes for Controlled Dual Release of Functional Molecules," *Appl. Mater. Interfaces*, Vol 5, 8241-8245, 2013.
- [52] T. Okuda, K. Tominaga, S. Kidoaki, "Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nanofiber meshes.," *J. Control. Release*, vol. 143, no. 2, pp. 258–64, 2010.
- [53] H. Yoon, G. Kim, "A three-dimensional polycaprolactone scaffold combined with a drug delivery system consisting of electrospun nanofibers," *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 2, pp. 22–23, 2011.
- [54] G. Kim, H. Yoon, Y. Park, "Drug release from various thicknesses of layered mats consisting of electrospun polycaprolactone and polyethylene oxide micro/nanofibers," *Appl. Phys. A*, vol. 100, no. 4, pp. 1197–1204, 2010.
- [55] X. Li, Y. Su, C. He, H. Wang, H. Fong, X. Mo, "Sorbitan monooleate and poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) electrospun nanofibers for endothelial cell interactions.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 91, no. 3, pp. 878–85, 2009.
- [56] L. Tian, M. P. Prabhakaran, X. Ding, D. Kai, S. Ramakrishna, "Emulsion electrospun vascular endothelial growth factor encapsulated poly(l-lactic acid-co-epsilon-caprolactone) nanofibers for sustained release in cardiac tissue engineering," *J. Mater. Sci.*, vol. 47, no. 7, pp. 3272–3281, 2011.
- [57] X. Li, Y. Su, S. Liu, L. Tan, X. Mo, S. Ramakrishna, "Encapsulation of proteins in poly(L-lactide-co-caprolactone) fibers by emulsion electrospinning.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 75, no. 2, pp. 418–24, 2010.
- [58] S. Y. Chew, J. Wen, E. K. F. Yim, K. W. Leong, "Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers.," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 4, pp. 2017–24, 2005.
- [59] S. Mareschek, A. Greiner, T. Kissel, "Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins.," *J. Control. Release*, vol. 127, no. 2, pp. 180–7, 2008.
- [60] Y. Peng, M. Ang, S. Foo, W. S. Lee, Z. Ma, S. S. Venkatraman, T. T. Wong, "Biocompatibility and biodegradation studies of subconjunctival implants in rabbit eyes.," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. 22507, 2011.
- [61] C. He, Z. Huang, X. Han, L. Liu, H. Zhang, L. Chen, "Coaxial electrospun poly(L-lactic acid) ultrafine fibers for sustained drug delivery," *J. Macromol. Sci. Part B Phys.*, vol. 45, no. 4, pp. 515–524, 2006.
- [62] J. C. Dias, C. Ribeiro, V. Sencadas, G. Botelho, J. L. G. Ribelles, S. Lanceros-Mendez, "Influence of fiber diameter and crystallinity on the stability of electrospun poly(l-lactic acid) membranes to hydrolytic degradation," *Polym. Test.*, vol. 31, no. 6, pp. 770–776, 2012.
- [63] N. Bölgen, Y. Z. Menciloğlu, K. Acatay, I. Vargel, E. Pişkin, "In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(epsilon-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions.," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 16, no. 12, pp. 1537–55, 2005.
- [64] 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.," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 5, pp. 1623–9, 2006.

-
- [65] S. C. Chen, X. B. Huang, X. M. Cai, J. Lu, J. Yuan, J. Shen, "The influence of fiber diameter of electrospun poly(lactic acid) on drug delivery," *Fibers Polym.*, vol. 13, no. 9, pp. 1120–1125, 2012.
- [66] J. L. Lowery, N. Datta, G. C. Rutledge, "Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibrous mats.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 491–504, 2010.
- [67] Q. P. Pham, U. Sharma, A. G. Mikos, "Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration.," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 10, pp. 2796–805, 2006.
- [68] A. Szentivanyi, T. Chakradeo, H. Zernetsch, B. Glasmacher, "Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 4–5, pp. 209–20, 2011.
- [69] J. B. Lee, S.I. Jeong, M.S. Bae, D.H. Yang, D.N. Heo, C.H. Kim, E. Alsberg, I.K. Kwon, "Highly porous electrospun nanofibers enhanced by ultrasonication for improved cellular infiltration," *Tissue Eng. Part A*, vol. 17, no. 21, pp. 2695–2702, 2011.
- [70] J. Sirc, S. Kubinova, R. Hobzova, D. Stranska, P. Kozlik, Z. Bosakova, D. Marekova, V. Holan, E. Sykova, J. Michalek, "Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 5315–25, 2012.
- [71] S. Srouji, D. Ben-David, R. Lotan, E. Livne, R. Avrahami, E. Zussman, "Slow-release human recombinant bone morphogenic protein-2 embedded within electrospun scaffolds for regeneration of bone defect: in vitro and in vivo evaluation," *Tissue Eng. Part A*, vol. 17, no. 3–4, pp. 269–277, 2011.
- [72] B. Song, C. Wu, J. Chang, "Dual drug release from electrospun poly(lactic-co-glycolic acid)/mesoporous silica nanoparticles composite mats with distinct release profiles.," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 5, pp. 1901–7, 2012.
- [73] D. W. Chen, Y.-H. Hsu, J.-Y. Liao, S.-J. Liu, J.-K. Chen, S. W.-N. Ueng, "Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes.," *Int. J. Pharm.*, vol. 430, no. 1–2, pp. 335–341, 2012.
- [74] H. Xu, H. Li, and J. Chang, "Controlled drug release from a polymer matrix by patterned electrospun nanofibers with controllable hydrophobicity," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 33, p. 4182, 2013.
- [75] H. B. Wang, M. E. Mullins, J. M. Cregg, A. Hurtado, M. Oudega, M. T. Trombley, R. J. Gilbert, "Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications.," *J. Neural Eng.*, vol. 6, no. 1, p. 016001, 2009.
- [76] Z. Feng, H.-J. Lu, M. K. Leach, N.-P. Huang, Y. Wang, C. Liu, Z. Gu, "The influence of type-I collagen-coated PLLA aligned nanofibers on growth of blood outgrowth endothelial cells.," *Biomed. Mater.*, vol. 5, no. 6, p. 065011, 2010.
- [77] Z. X. Meng, X. X. Xu, W. Zheng, H. M. Zhou, L. Li, Y. F. Zheng, X. Lou, "Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 84, no. 1, pp. 97–102, 2011.

- [78] S. Sage, Daniel (Biomedical Image Group (BIG), EPFL, "OrientationJ ImageJ's plugin for directional analysis in images." Dostęp on-line 25 stycznia 2014: <http://bigwww.epfl.ch/demo/orientation/>
- [79] N. K. Mohtaram, J. Ko, M. Carlson, M. B. Jun, S. M. Willerth, "Nanofabrication of electrospun fibers for controlled release of retinoic acid," in Proceedings of the 8th International Conference on MicroManufacturing, 2013, pp. 432–437.
- [80] N. A. Peppas, "Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 1, pp. 5–9, 2013.
- [81] J. Siepmann, F. Siepmann, "Mathematical modeling of drug delivery.," *Int. J. Pharm.*, vol. 364, no. 2, pp. 328–43, 2008.
- [82] M. J. McGirt, H. Brem, "Carmustine wafers (Gliadel) plus concomitant temozolomide therapy after resection of malignant astrocytoma: growing evidence for safety and efficacy.," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 17, no. 7, pp. 1729–31, 2010.
- [83] J. Perry, A. Chambers, K. Spithoff, N. Laperriere, "Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma: a systematic review.," *Curr. Oncol.*, vol. 14, no. 5, pp. 189–94, 2007.
- [84] C.H. C. Wang, J. Li, C. S. Teo, T. Lee, "The delivery of BCNU to brain tumors," *J. Control. Release*, vol. 61, no. 1–2, pp. 21–41, 1999.
- [85] M. Chasin, D. Lewis, R. Langer, "Polyanhydrides for controlled release," *Biopharm. Manuf.*, vol. 1, pp. 33–46, 1988.
- [86] L. L. Lao, N. A Peppas, F. Y. C. Boey, S. S. Venkatraman, "Modeling of drug release from bulk-degrading polymers.," *Int. J. Pharm.*, vol. 418, no. 1, pp. 28–41, 2010.
- [87] J. Siepmann, N. A. Peppas, "Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse.," *Int. J. Pharm.*, vol. 418, no. 1, pp. 6–12, 2011.
- [88] D. Cooney, "Effect of geometry on the dissolution of pharmaceutical tablets and other solids: surface detachment kinetics controlling," *AIChE J.*, vol. 18, pp. 446–449, 1972.
- [89] H. Hopfenberg, "Controlled release from erodible slabs, cylinders, and spheres.," *Control. release Polym. Formul. ACS Symp.*, vol. 33, pp. 26–32, 1976.
- [90] L. Huang, C. Branford-White, X.-X. Shen, D.-G. Yu, L. Zhu, "Time-engineered biphasic drug release by electrospun nanofiber meshes.," *Int. J. Pharm.*, vol. 436, no. 1–2, pp. 88–96, 2012.
- [91] M. Jannesari, J. Varshosaz, M. Morshed, M. Zamani, "Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 993–1003, 2011.
- [92] T. T. Nguyen, C. Ghosh, S.-G. Hwang, N. Chanunpanich, J. S. Park, "Porous core/sheath composite nanofibers fabricated by coaxial electrospinning as a potential mat for drug release system.," *Int. J. Pharm.*, vol. 439, no. 1–2, pp. 296–306, 2012.
- [93] P. Taepaiboon, U. Rungsardthong, P. Supaphol, "Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 67, no. 2, pp. 387–97, 2007.

-
- [94] D. G. Yu, X. Wang, X. Y. Li, W. Chian, Y. Li, Y. Z. Liao, "Electrospun biphasic drug release polyvinylpyrrolidone/ethyl cellulose core/sheath nanofibers.," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 3, pp. 5665–72, 2013.
- [95] T. Huguchi, "Mechanism of sustained-action medication," *J. Pharm. Sci.*, vol. 52, no. 12, pp. 1145–1149, 1963.
- [96] J. Siepmann, F. Siepmann, "Modeling of diffusion controlled drug delivery.," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 351–62, 2011.
- [97] J. Crank, *The mathematics of Diffusion*. Clarendon Oxford Press, 1975.
- [98] J. M. Vergnaud, *Controlled drug release of oral dosage forms*, Ellis Horwood New York, 1993.
- [99] L. Zeng, X. Wu, "Modeling the sustained release of lipophilic drugs from liposomes," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 97, no. 7, p. 073701, 2010.
- [100] L. Zeng, L. An, X. Wu, "Modeling drug-carrier interaction in the drug release from nanocarriers.," *J. Drug Deliv.*, vol. 2011, p. 370308, 2011.
- [101] A. R. Tzafriri, "Mathematical modeling of diffusion-mediated release from bulk degrading matrices.," *J. Control. Release*, vol. 63, no. 1–2, pp. 69–79, 2000.
- [102] Y. Zhou, X. Y. Wu, "Finite element analysis of diffusional drug release from complex matrix systems. I. Complex geometries and composite structures 1," vol. 49, pp. 277–288, 1997.
- [103] D. L. Bernik, D. Zubiri, M. E. Monge, R. M. Negri, "New kinetic model of drug release from swollen gels under non-sink conditions," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 273, no. 1–3, pp. 165–173, 2006.
- [104] M. Grassi, G. Grassi, "Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems.," *Curr. Drug Deliv.*, vol. 2, no. 1, pp. 97–116, 2005.
- [105] P. Nakielski, "Symulacje numeryczne procesu desorpcji i dyfuzji leku w materiale z nanowłókien," *Model. inż.*, vol. 48, pp. 99–111, 2013.
- [106] M. Frontczak-Baniewicz, S. J. Chrapusta, D. Sulejczak, "Long-term consequences of surgical brain injury - characteristics of the neurovascular unit and formation and demise of the glial scar in a rat model.," *Folia Neuropathol.*, vol. 49, no. 3, pp. 204–18, 2011.
- [107] W. Sylwanowicz, A. Michajlik, W. Romotowski, *Anatomia i fizjologia człowieka. Podręcznik dla średnich szkół medycznych*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1980.
- [108] M. Faul, L. Xu, M. Wald, V. Coronado, "Traumatic brain injury in the United States: emergency department visits, hospitalizations and deaths 2002–2006," *Natl. Cent. Inj. Prev. Control*, 2010.
- [109] J. T. Flaada, C. L. Leibson, J. N. Mandrekar, N. Diehl, P. K. Perkins, A. W. Brown, J. F. Malec, "Relative risk of mortality after traumatic brain injury: a population-based study of the role of age and injury severity.," *J. Neurotrauma*, vol. 24, no. 3, pp. 435–45, 2007.
- [110] A. W. Brown, A. M. Moessner, J. Mandrekar, N. N. Diehl, C. L. Leibson, J. F. Malec, "A survey of very-long-term outcomes after traumatic brain injury among members of a population-based incident cohort.," *J. Neurotrauma*, vol. 28, no. 2, pp. 167–76, 2011.

- [111] A. A. Linninger, M. R. Somayaji, T. Erickson, X. Guo, R. D. Penn, "Computational methods for predicting drug transport in anisotropic and heterogeneous brain tissue.," *J. Biomech.*, vol. 41, no. 10, pp. 2176–87, 2008.
- [112] C. S. Teo, W. Hor Keong Tan, T. Lee, C.-H. Wang, "Transient interstitial fluid flow in brain tumors: Effect on drug delivery," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 60, no. 17, pp. 4803–4821, 2005.
- [113] J. Siepmann, F. Siepmann, A. T. Florence, "Local controlled drug delivery to the brain: mathematical modeling of the underlying mass transport mechanisms.," *Int. J. Pharm.*, vol. 314, no. 2, pp. 101–19, 2006.
- [114] Z.J. Chen, W. C. Broaddus, R. R. Viswanathan, R. Raghavan, G. T. Gillies, "Intraparenchymal drug delivery via positive-pressure infusion: experimental and modeling studies of poroelasticity in brain phantom gels.," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 49, no. 2, pp. 85–96, 2002.
- [115] A. Kamal-Eldin, L. A. Appelqvist, "The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols.," *Lipids*, vol. 31, no. 7, pp. 671–701, 1996.
- [116] C. E. Krewson, W. M. Saltzman, "Transport and elimination of recombinant human NGF during long-term delivery to the brain.," *Brain Res.*, vol. 727, no. 1–2, pp. 169–81, 1996.
- [117] K. J. Lampe, D. S. Kern, M. J. Mahoney, K. B. Bjugstad, "The administration of BDNF and GDNF to the brain via PLGA microparticles patterned within a degradable PEG-based hydrogel: Protein distribution and the glial response.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 96, no. 3, pp. 595–607, 2011.
- [118] M. Rutkowski, K. Grzegorzczak, Modifications of spectrophotometric methods for antioxidative vitamins determination convenient in analytic practice, *Acta Sci Pol*, vol. 6, pp. 17-28, 2007.
- [119] M. Roth, "Fluorescence reaction for amino acids.," *Anal. Chem.*, vol. 43, no. 7, pp. 880–2, 1971.
- [120] M. Brugnara, "Contact Angle plugin for ImageJ." Dostęp on-line 25 stycznia 2014: <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/contact-angle.html>.
- [121] Matlab, Mathworks Inc., <http://www.mathworks.com>
- [122] J. Juza, "The pendant drop method of surface tension measurement: equation interpolating the shape factor tables for several selected planes", *Czechoslov. J. Phys.*, vol. 47, pp. 351-357, 1997.
- [123] D. Soumpasis, "Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments," *Biophys. J.*, pp. 95–97, 1983.
- [124] N. Sindhvani, O. Ivanchenko, E. Lueshen, K. Prem, A.A. Linninger, "Methods for determining agent concentration profiles in agarose gel during convection-enhanced delivery.," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 58, no. 3, pp. 626–32, 2011.
- [125] P. Nakielski, T. Kowalczyk, K. Zembrzycki, T.A. Kowalewski, "Experimental and numerical evaluation of drug release from nanofiber mats to brain tissue", *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, on-line, 2014
- [126] Comsol Multiphysics®, Comsol Inc., www.comsol.com.
- [127] T. Chung, *Computational fluid dynamics*, Second. Edt., New York, NY: Cambridge University Press, 2010, p. 1058.
- [128] D. Kuzmin, *A guide to Numerical methods for transport equations*. Friedrich Alexander Universität Erlangen Nürnberg, 2010, p. 226.

-
- [129] E. M. Johnson, D. A. Berk, R. K. Jain, W. M. Deen, "Hindered diffusion in agarose gels: test of effective medium model.," *Biophys. J.*, vol. 70, no. 2, pp. 1017–23, 1996.
- [130] R. Phillips, "A hydrodynamic model for hindered diffusion of proteins and micelles in hydrogels.," *Biophys. J.*, vol. 79, pp. 3350–3354, 2000.
- [131] D. S. Clague, R. J. Phillips, "Hindered diffusion of spherical macromolecules through dilute fibrous media," *Phys. Fluids*, vol. 8, no. 7, p. 1720, 1996.
- [132] T. Stylianopoulos, A. Yeckel, J. J. Derby, X.-J. Luo, M. S. Shephard, E. A. Sander, V. H. Barocas, "Permeability calculations in three-dimensional isotropic and oriented fiber networks.," *Phys. fluids*, vol. 20, no. 12, p. 123601, 2008.
- [133] W. Perrins, "Transport properties of regular arrays of cylinders," *Proc. R. Soc. L.*, vol. 369, pp. 207–225, 1979.
- [134] L. Johansson, J. Löfroth, "Diffusion and interaction in gels and solutions. 4. Hard sphere Brownian dynamics simulations," *J. Chem. Phys.*, vol. 98, no. 9, pp. 7471–7479, 1993.
- [135] B. Amsden, "Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models," *Macromolecules*, vol. 31, no. 23, pp. 8382–8395, 1998.
- [136] M. Gandhi, R. Srikar, A. L. Yarin, C. M. Megaridis, R. a Gemeinhart, "Mechanistic examination of protein release from polymer nanofibers.," *Mol. Pharm.*, vol. 6, no. 2, pp. 641–7, 2009.
- [137] E. Washburn, "The dynamics of capillary flow," *Phys. Rev.*, vol. 17, pp. 273–283, 1921.
- [138] V. N. Phan, N.-T. Nguyen, C. Yang, P. Joseph, L. Djeghlaf, D. Bourrier, A.-M. Gue, "Capillary filling in closed end nanochannels.," *Langmuir*, vol. 26, no. 16, pp. 13251–5, 2010.
- [139] R. Blagoeva, A. Nedev, "Monolithic Controlled Delivery Systems : Part II . Basic Mathematical Models," *Bioautomation*, pp. 106–117, 2006.
- [140] I. Galdi, G. Lamberti, "Drug release from matrix systems: analysis by finite element methods," *Heat Mass Transf.*, vol. 48, no. 3, pp. 519–528, 2011.
- [141] M. Manzano, G. Lamberti, I. Galdi, M. Vallet-Regí, "Anti-osteoporotic drug release from ordered mesoporous bioceramics: experiments and modeling.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 12, no. 4, pp. 1193–9, 2011.
- [142] K. Miller, V. Kurtcuoglu, "Biomechanics of the brain," pp. 169–188, 2011.
- [143] S. Gupta, M. Soellinger, P. Boesiger, D. Poulikakos, V. Kurtcuoglu, "Three-dimensional computational modeling of subject-specific cerebrospinal fluid flow in the subarachnoid space.," *J. Biomech. Eng.*, vol. 131, no. 2, p. 021010, 2009.
- [144] S. Gupta, M. Soellinger, D. M. Grzybowski, P. Boesiger, J. Biddiscombe, D. Poulikakos, V. Kurtcuoglu, "Cerebrospinal fluid dynamics in the human cranial subarachnoid space: an overlooked mediator of cerebral disease. I. Computational model.," *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, no. 49, pp. 1195–204, 2010.
- [145] A. A. Linninger, C. Tsakiris, D. C. Zhu, M. Xenos, P. Roycewicz, Z. Danziger, R. Penn, "Pulsatile cerebrospinal fluid dynamics in the human brain.," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 52, no. 4, pp. 557–65, 2005.
- [146] M. Modi, R. Mullapudi, M. R. Somayaji, M. Xenos, A. A. Linninger, D. C. Zhu, R. Penn, "Mimics – An indispensable tool for patient-specific image analysis subarachnoid space," *Brain*, pp. 1–10, 2006.

- [147] B. Sweetman, M. Xenos, L. Zitella, A. A. Linninger, "Computational prediction of cerebrospinal fluid flow in the human brain.," *Comput. Biol. Med.*, vol. 41, no. 2, pp. 67–75, 2011.
- [148] S. Yan, L. Xiaoqiang, L. Shuiping, M. Xiumei, S. Ramakrishna, "Controlled release of dual drugs from emulsion electrospun nanofibrous mats.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 73, no. 2, pp. 376–81, 2009.
- [149] T. Stylianopoulos, B. Diop-Frimpong, L. L. Munn, R. K. Jain, "Diffusion anisotropy in collagen gels and tumors: the effect of fiber network orientation.," *Biophys. J.*, vol. 99, no. 10, pp. 3119–28, 2010.
- [150] J. Andrychowski, M. Frontczak-Baniewicz, D. Sulejczak, T. Kowalczyk, T. Chmielewski, Z. Czernicki, T. A. Kowalewski, "Nanofiber nets in prevention of cicatrization in spinal procedures. Experimental study," *Folia Neuropathol.*, vol. 2, pp. 147–157, 2013.
- [151] D. Sulejczak, J. Andrychowski, T. Kowalczyk, P. Nakielski, M. Frontczak-Baniewicz, T. A. Kowalewski, "Electrospun nanofiber mat as a protector against the consequences of brain injury," *Folia Neuropathol.*, vol. 52, no. 1, pp. 56–69, 2014.
- [152] C. E. Krewson, M. L. Klarman, W. M. Saltzman, "Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium.," *Brain Res.*, vol. 680, no. 1–2, pp. 196–206, 1995.
- [153] A. L. Yarin, "Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 22, no. 3, pp. 310–317, 2011.
- [154] H. Zhang, C. Zhao, Y. Zhao, G. Tang, X. Yuan, "Electrospinning of ultrafine core/shell fibers for biomedical applications," *Sci. China Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1246–1254, 2010.
- [155] A. L. Yarin, E. Zussman, J. H. Wendorff, A. Greiner, "Material encapsulation and transport in core-shell micro/nanofibers, polymer and carbon nanotubes and micro/nanochannels," *J. Mater. Chem.*, vol. 17, no. 25, p. 2585, 2007.
- [156] Y. Z. Zhang, X. Wang, Y. Feng, J. Li, C. T. Lim, S. Ramakrishna, "Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)-encapsulated poly(epsilon-caprolactone) nanofibers for sustained release." *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 4, pp. 1049–57, 2006.
- [157] T. A. Kowalewski, T. Kowalczyk, P. Nakielski, J. Andrychowski, M. Frontczak-Baniewicz, D. Sulejczak, Raport z grantu NCBiR nr NR130081010: „Zastosowanie elektroprzędzonych nanowłókien jako opatrunków aktywnych w zapobieganiu pourazowym zmianom w tkance mózgowej” 2013.
- [158] P. McGeer, E. McGeer, "The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases," *Brain Res. Rev.*, vol. 21, no. 1995, pp. 195–218, 1995.
- [159] J. Anderson, "Inflammatory response to implants," *ASAIO J.*, vol. 34, pp. 101–107, 1988.
- [160] J. Andrychowski, M. Frontczak-Baniewicz, D. Sulejczak, T. Kowalczyk, T. A. Kowalewski, P. Nakielski, "Zastosowanie opatrunków z nanowłókien polimerowych w zapobieganiu pourazowym zmianom w mózgu. P.404667," 2013.
- [161] P. Nakielski, T. Kowalczyk, T. A. Kowalewski, "Delivery system based on polymer nanofibers," *IPPT Reports Fundam. Technol. Res.*, vol. 47, no. 4, pp. 19–24, 2013.