



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ ИНЖЕЊЕРСКИХ НАУКА
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Катарина Д. Виријевић

**Синтеза полимерних наноматеријала
методом електроспининга и примена у
области ткивног инжењеринга**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF ENGINEERING
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Katarina D. Virijević

**Synthesis of polymer nanomaterials by the
electrospinning method and application in the
field of tissue engineering**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

Аутор
Име и презиме: Катарина Д. Виријевић
Датум и место рођења: 27.03.1992. године, Јереван, Јерменија
Садашње запослење: Истраживач сарадник на Институту за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: СИНТЕЗА ПОЛИМЕРНИХ НАНОМАТЕРИЈАЛА МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОСПИНИНГА И ПРИМЕНА У ОБЛАСТИ ТКИВНОГ ИНЖЕЊЕРИНГА
Број страница: 148
Број слика: 58 слика
Број библиографских података: 352
Установа и место где је рад израђен: Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Машинско инжењерство и Медицинске науке
Ментор: др Марко Живановић, научни саветник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу Коментор: др Ненад Филиповић, редовни професор, Факултет инжењерских наука, Универзитет у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-07-905/3 од 16.12.2024. год.

Захвалница

Експериментални део ове докторске дисертације реализован је у Лабораторији за Биоинжењеринг на Институту за информационе технологије у Крагујевцу, као и на Технолошком Универзитету у Бечу, у Аустрији.

На крају овог значајног и изазовног пута, који је резултовао завршеном докторском дисертацијом, изражавам дубоку захвалност свима који су подржали и допринели мом академском остварењу.

Прво, захваљујем свом ментору, др Марку Живановићу на помоћи током истраживања и корисним сугестијама током израде ове докторске дисертације. Коментору др професору Ненаду Филиповићу се захваљујем на изузетној сарадњи и стручним саветима. Такође, велику захвалност дугујем др. професорки Фатими Живић на конструктивној критици која је допринела њеној финалној форми.

Неизмерну захвалност дугујем мојој породици, посебно родитељима, који су ми одувек били ослонац и подршка. Њихова безусловна љубав и разумевање, као и живот који су поднели, били су темељ свих мојих напора.

Захваљујем и својим пријатељима и колегама који су ми били подршка током студија, и охрабривали ме да наставим у моментима сумње. Посебну захвалност дугујем мојим драгим пријатељима из Русије, чија су несебична подршка, искрено пријатељство и свакодневна охрабрења били непроцењиви. Без њихове вере у мене и безусловне подршке, ова докторска дисертација не би била могућа.

В знак памяти моей родной и любимой Дарье

РЕЗИМЕ

Истраживање спроведено за потребе израде ове дисертације је имало за циљ добијање полимерних нановлакна помоћу електроспининг технологије, са циљем развоја напредних материјала за примену у биомедицинском пољу. Испитиване класе полимера у оквиру овог истраживања су укључивале синтетичке полимере, као што су поли(ε-капролактон) (PCL), полиетилен гликол (PEG), и природне биолошки активне полимере, као што су протеини (желатин) и полисахариди (хитозан). Основни циљ истраживања се базирао на оптимизацији хемијског састава полимерних раствора како би се добила нановлакна (скефолди) погодна за примену у третманима убрзаног зарастања рана. Услови експеримента су били контролисани и праћени како би се уочила њихова промена на утицај параметара добијених нановлакна. Након тога, прикупљени подаци су употребљени за обуку модела неуронске мреже, са циљем дефинисања оптималних услова за добијање жељених карактеристика нановлакна.

Нановлакна добијена из свих тестираних класа полимера анализирана су кроз *in vitro* и *in vivo* методе. Као додатан корак, нановлакна су била импрегнирана комерцијалним антибиотским агенсима, као што су ципрофлоксацин хидрохлорид и гентамицин сулфат, ради побољшања терапеутских својстава материјала за примене у регенерацији коже. Карактеризација нановлакна је извршена коришћењем различитих техника, укључујући скенирајућу електронску микроскопију (SEM), енергетску дисперзивну спектроскопију (SEM/EDS), микроскопију атомских сила (AFM) и инфрацрвену спектроскопију Фуријеове трансформације (FTIR), да би се проценила морфологија, структура и текстура влакна. *In vitro* тестови су укључивали токсиколошке и микробиолошке анализе, мерења апсорпције воде и деградације у физиолошким условима, док *in vivo* тестови су били примењени на моделима пацова и кокошијих јаја за процену биокомпатибилности, регенеративних и неоангиогених својстава. Резултати су показали да синтетисана нановлакна поседују особине биокомпатибилности, значајну антибактеријску активност према испитиваним патогенима, као и способност да убрзају зарастање рана и регенерацију ткива уз спречавање инфекција. Добијене карактеристике указују на значајан потенцијал синтетисаних нановлакна за развој иновативних материјала са применом у ткивном инжењерингу.

У израду ове докторске дисертације биле су укључене и институције: *Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак”, Београд; Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Београд; Институт за нуклеарне науке „Винча”, Београд; Технолошко-металушки факултет Универзитета у Београду; Институт за лаке конструкције и структурну биомеханику, Технички универзитет у Бечу, Аустрија; Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу; Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу;*

Кључне речи: нановлакна, полимери, ткивни инжењеринг, вештачка интелигенција, зарастање рана

ABSTRACT

The research conducted for this dissertation aimed to obtain polymer nanofibers using electrospinning technology, aiming to develop advanced materials for biomedical applications. The polymer classes examined in this research included synthetic polymers, such as poly(ϵ -caprolactone) (PCL), polyethylene glycol (PEG), and natural biologically active polymers, such as proteins (gelatin) and carbohydrates (chitosan). The main goal of the research was to optimize the chemical composition of polymer solutions in order to obtain nanofibers (scaffolds) suitable for use in accelerated wound healing treatments. The experimental conditions were controlled and monitored to observe their influence on the parameters of the obtained nanofibers. After that, the data were collected and used to train a neural network model to set the experimental conditions further to obtain the desired characteristics of the nanofibers.

Nanofibers obtained from all tested polymer classes were analyzed through *in vitro* and *in vivo* methods. As an additional step, the nanofibers were impregnated with commercial antibiotic agents, such as ciprofloxacin hydrochloride and gentamicin sulfate, to improve the therapeutic properties of the materials for applications in skin regeneration. Characterization of the nanofibers was performed using various techniques, including scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (SEM/EDS), atomic force microscopy (AFM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), to evaluate the morphology, structure, and texture of the nanofibers. *In vitro* tests included toxicological and microbiological analyses, water absorption and degradation measurements under physiological conditions, as well as *in vivo* tests in rat and egg models to assess biocompatibility, regenerative, and neoangiogenic properties. The results showed that the synthesized nanofibers possess biocompatibility properties, significant antibacterial activity against the tested pathogens, as well as the ability to accelerate wound healing and tissue regeneration while preventing infections. These characteristics indicate the high potential of synthesized nanofibers for the development of innovative materials with applications in tissue engineering.

The following institutions were also involved in the development of this doctoral dissertation: *the Institute of Virology, Vaccines and Sera "Torlak", Belgrade; the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade; the Vinča Institute of Nuclear Sciences, Belgrade; the Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade; the Institute of Lightweight Design and Structural Biomechanics, Vienna University of Technology, Austria; the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac; and the Faculty of Science, University of Kragujevac.*

Keywords: nanofibers, polymers, tissue engineering, artificial intelligence, wound healing

САДРЖАЈ

1.	УВОД.....	1
1.1	Нановлакна у ткивном инжењерингу.....	1
1.2	Електроспининг: Технологија за синтезу нановлакна.....	4
1.2.1	Еволуција електроспининга: Историјски развој и принципи.....	4
1.2.2	Основе процеса електроспининга.....	6
1.2.3	Формирање Тејлоровог конуса.....	7
1.3	Оптимизација услова и параметара процеса.....	8
1.3.1	Параметри процеса.....	9
1.3.2	Параметри раствора полимера.....	11
1.3.3	Параметри средине.....	13
1.4	Типови морфологије влакана.....	16
1.4.1	Полимери. Класификација полимера.....	17
1.4.2	Синтетички полимери.....	18
1.4.3	Природни полимери.....	21
1.4.4	Растварачи у производњи нановлакна.....	23
1.5	Анализа и карактеризација полимерних нановлакна.....	24
1.6	Ткивни инжењеринг.....	29
1.6.1	Кожа. Хистолошка грађа коже.....	32
1.6.2	Зарастање рана.....	35
2	ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	39
2.1	Хипотезе истраживања.....	39
2.2	Специфични циљеви истраживања.....	39
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	40
3.1	Хемикалије и реагенси.....	40
3.2	Део 1. Синтетички скефолди.....	41
3.2.1	Data mining анализа.....	41
3.2.2	Припрема раствора полимера.....	41
3.2.3	Процес електроспининга.....	42
3.2.4	Морфолошка карактеризација влакана.....	43
3.2.5	Модел вештачке неуронске мреже (ANN).....	44
3.2.6	Гајење и засејавање ћелија.....	45
3.2.7	<i>In vivo</i> тест хориоалантоичне мембране пилећег ембриона (CAM).....	47
3.2.8	Зарастање рана у <i>in vivo</i> условима.....	49
3.3	Део 2. Протеински скефолди.....	50

3.3.1	Припрема раствора желатина	50
3.3.2	Процес умрежавања (crosslinking).....	50
3.3.3	Утицај киселости и pH вредности влакана на физиолошку средину	50
3.3.4	Морфолошка карактеризација влакана.....	51
3.3.5	FTIR и EDS анализа	51
3.3.6	Испитивање степена апсорпције и деградације	51
3.3.7	Испитивање цитотоксичности и вијабилности	51
3.3.8	Анализа антибактеријске активности	51
3.3.9	<i>In vivo</i> тест хориоалантоичне мембране пилећег ембриона (CAM).....	51
3.3.10	Зарастање рана у <i>in vivo</i> условима	52
3.4	Део 3. Полисахариди.....	53
3.4.1	Припрема раствора полимера хитозана.....	53
3.4.2	Морфолошка карактеризација влакана.....	53
3.4.3	FTIR анализа.....	53
3.4.4	Испитивање степена апсорпције и деградације	53
3.4.5	Испитивање цитотоксичности и вијабилности	53
3.4.6	Анализа антибактеријске активности	53
3.4.7	Зарастање рана у <i>in vivo</i> условима	53
3.4.8	Статистичка анализа.....	54
4	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	55
4.1	Део 1. Синтетички скефолди.....	55
4.1.1	Data mining анализа	55
4.1.2	Морфолошка карактеризација PCL/PEG влакана.....	56
4.1.3	Механичка својства и биокompatibilност влакана.....	60
4.1.4	Модел вештачке неуронске мреже (ANN)	61
4.1.5	Испитивање степена апсорпције и деградације	65
4.1.6	Испитивање цитотоксичности и вијабилности	67
4.1.7	Анализа антибактеријске активности	69
4.1.8	Зарастање рана у <i>in vitro</i> условима (скреч есеј)	71
4.1.9	<i>In vivo</i> тест хориоалантоичне мембране пилећег ембриона (CAM).....	72
4.1.10	Зарастање рана у <i>in vivo</i> условима	74
4.2	Део 2. Протеински скефолди.....	77
4.2.1	Процес умрежавања скефолда (crosslinking).....	77
4.2.2	Утицај киселости и pH вредности влакана на физиолошку средину	79
4.2.3	Морфолошка карактеризација влакана желатина.....	80

4.2.4	FTIR и EDS анализа	82
4.2.5	Испитивање степена апсорпције и деградације	85
4.2.6	Испитивање цитотоксичности и вијабилности	88
4.2.7	Анализа антибактеријске активности	90
4.2.8	<i>In vivo</i> тест хориоалантоичне мембране пилећег ембриона (CAM).....	92
4.2.9	Зарастање рана у <i>in vivo</i> условима	94
4.3	Део 3. Полисахариди.....	97
4.3.1	Морфолошка карактеризација влакана хитозана	97
4.3.2	FTIR анализа.....	100
4.3.3	Испитивање степена апсорпције и деградације	102
4.3.4	Испитивање цитотоксичности и вијабилности	104
4.3.5	Анализа антибактеријске активности	106
4.3.6	Зарастање рана у <i>in vivo</i> условима.....	108
5	Закључак.....	111
	Литература.....	114
	Прилози.....	137
	Прилог А. Статистичка анализа и примена вештачке интелигенције	137
	Прилог Б. Морфолошка дистрибуција влакана у зависности од примењених хемијских параметара раствора	138

Листа скраћеница

AsA - Сирћетна киселина

ADMSC – Адипозне мезенхимске матичне ћелије

ADP – Аденозин дифосфат

AFM – Микроскопија атомских сила

ANN – Вештачка неуронска мрежа

ATCC – The American Type Culture Collection

bFGF – Базични фактор раста фибробласта

CAM – Хориоалантоична мембрана

DMF – Диметилформамид

DMEM – Медијум за гајење ћелија

DMSO – Диметилсулфоксид

ДНК – Дезоксирибонуклеинска киселина

ECM – Екстрацелуларни матрикс

EGF – Епидермални фактор раста

EDTA – Етилендиаминтетрасирћетна киселина

EDS – Енергетска дисперзивна спектроскопија

FBS – Фетални говеђи серум

FTIR – Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом

GA – Глутаралдехид

GAG – Гликозаминогликан

HEMA – 2-хидроксиетил метакрилат

IGF – Insulin growth factor

IL-1 α – Интерлеукин-1 α

IL-1 β – Интерлеукин-1 β

IL-6 – Интерлеукин-6

MLP – Вишеслојна перцептронска неуронска мрежа

MTT– 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолијум бромид)

ОМ – Оптички микроскоп

PBS – Раствор фосфатног пуфера

PCC – Пирсонов коефицијент корелације

PCL – Поликапролактон

PDGF - Тромбоцити фактор раста

PDGF-BB – Тромбоцити фактор раста

PEG – Полиетиленгликол

PEO – Полиетилен оксид

PFA – Параформалдехид

PLA – Поли(лактидна) киселина

PLLA – Поли(L-лактидна) киселина

PMSE – Проценат просечне квадратне грешке

SEM – Скенирујућа електронска микроскопија

TEM – Трансмисиона електронска микроскопија

TNF – Tumor necrosis factor

(TNF)- α – (Tumor necrosis factor)- α

VEGF – Васкуларни ендотелни фактор раста

H&E – Хематоксилин и еозин

СПИСАК СЛИКА

Слика 1. Приказ уређаја за електроспининг у лабораторији за биоинжењеринг	6
Слика 2. Зависност облика млаза раствора полимера од примењеног напона а) стварање и ширење једног млаза раствора б) истезање млаза раствора б) више млазева одједном	10
Слика 3. Различите структуре добијених влакана у зависности од молекулске масе полимера. а) релативно мала молекулска маса б) релативно средња молекулска маса, и в) релативно велика молекулска маса	11
Слика 4. Структуре добијених влакана са различитом вискозношћу раствора. а) раствор са релативно великом вискозношћу б) раствор са релативно малом вискозношћу	12
Слика 5. Структурна формула поликапролактона (PCL)	19
Слика 6. Добијање полилактидне киселине (PLA)	20
Слика 7. Структурна формула полиетиленгликола (PEG)	20
Слика 8. Хемијска структура желатина	21
Слика 9. Хемијска структура хитозана	22
Слика 10. Оптички микроскоп	25
Слика 11. Шематски приказ SEM инструмента. Слика је креирана помоћу Biorender.com.	25
Слика 12. Шематски приказ TEM инструмента. Слика је креирана помоћу Biorender.com.	26
Слика 13. Процес рада AFM инструмента	27
Слика 14. Резултат модула индентације за испитивана PCL:PEG влакна	28
Слика 15. FTIR инструмент и пример добијеног спектра	28
Слика 16. Развој ткивног инжењеринга кроз историју. Слика је креирана помоћу Biorender.com	30
Слика 17. Примена влакана у ткивном инжењерингу. Слика је креирана помоћу Biorender.com	32
Слика 18. Структура коже. Слика је креирана помоћу Biorender.com.	33
Слика 19. Приказ епидермалне структуре и њених слојева. Слика је креирана помоћу Biorender.com	33
Слика 20. Шематски приказ фаза регенерације коже. Слика је креирана помоћу Biorender.com	35
Слика 21. Процес регенерације коже уз примену биомиметичких материјала (Извор: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780081021927000102 , модификовано)	38
Слика 22. а) Шематски приказ електроспининг процеса б) Извођење електроспининг процеса у лабораторији за биоинжењеринг	43
Слика 23. Процедура САМ анализе пилећег ембриона: А) Одабир јаја Б) Дезинфекција јаја са 10% раствора јода В) Инокулација и припрема за имплантацију скефолда Г) Инкубација јајета Д) Свакодневно праћење развоја ембриона и могуће контаминације Ћ) Жртвовање третираних ембриона и фиксација са 4% раствором PFA Е) Припрема САМ мембране Ж) Снимање и евалуација слике крвних судова	49

Слика 24. Микрографије влакана добијене са оптичког микроскопа за сваку појединачну концентрацију серије 16 у опсегу 17-27%. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ђ) 22% Е) 23% Ж) 24% И) 25% Ј) 26% раствор Ј) 27%.	57
Слика 25. SEM слике влакана серије 16: PCL/PEG (7:3) у CHCL ₃ /DMF (7:3). А) Скефолд без ћелија (увећање 1000 кх) Б) Скефолд засејан ADMSC ћелијама (увећање 5.000 кх), и увећана ADMSC ћелија (увећање од 10.000 кх).	59
Слика 26. Приказ мерења индентације појединачних влакана: А) Мапе висине и модула индентације као и профил попречног пресека примерног влакна. Б) Обједињени модули индентације, добијени из свих изабраних сила-кривих за сва влакна, приказани као дистрибуција прилагођена Гаусовој функцији у сувим и хидратисаним условима. Средња вредност износи 198.4 ± 88.7 МПа. В) Поређење индивидуалних вредности модула индентације појединачних у сувим и хидратисаним условима. Сва мерења су спроведена на узорцима са 22% PCL/PEG (70:30) у CHCL ₃ /DMF (70:30).	60
Слика 27. Шематски приказ неуронске мреже	62
Слика 28. Графикон RMSE везе између скупа података за обуку (плава линија) и скупа података за валидацију (наранџаста линија) у зависности од броја неурона у скривеном слоју.....	63
Слика 29. Графички приказ прецизности ANN модела. Хоризонтална оса представља проценат стварних (експерименталних) резултата, док вертикална оса приказује проценат вредности предвиђених од стране неуронске мреже. Подаци из скупа за обуку су приказани плавим тачкама, док су подаци из скупа за тестирање наранџастим тачкама. Идеална линија (дијагонала) представља савршено поклапање предвиђених и стварних вредности	63
Слика 30. Тест деградације. Вредности представљају средњу вредност ± SD за 5 експеримената. * $p < 0.05$ у поређењу са контролом (100%), $p < 0.05$ у поређењу са различитим временским тачкама (недељама).	67
Слика 31. Вијабилност MRC-5 ћелија након третмана са PCL/PEG скефолдом током 120 сати. * $p < 0.05$ у поређењу са контролом (100%).	68
Слика 32. Утицај третмана PCL/PEG скефолда на а) <i>P. aeruginosa</i> PAO1 - PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин б) <i>P. aeruginosa</i> PAO1 - PCL/PEG/0.1% гентамицин в) <i>S. aureus</i> 25923 - PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин г) <i>S. aureus</i> 25923 - PCL/PEG/0.1% гентамицин д) <i>S. aureus</i> MRSA 43300 - PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин ђ) <i>S. aureus</i> MRSA 43300 - PCL/PEG/0.1% гентамицин.	71
Слика 33. <i>In vitro</i> ефекат PCL/PEG скефолда на миграцију фибробласта. (А) Празно подручје без MRC-5 ћелија без третмана (без скефолда) – скала 200 μ м; (Б) Графички приказ резултата након анализе релативне пукотине израчунате са Сlike 33А.	72
Слика 34. Средње вредности броја формираних крвних судова у оквиру експерименталних група: а) Контрола б) PCL/PEG в) PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин г) PCL/PEG/0.1% гентамицин скефолди. * $p < 0.05$ у поређењу са контролом (100%).....	73
Слика 35. Резултати процеса зарастања рана након третмана PCL/PEG скефолдима у <i>in vivo</i> условима. А) Макроскопска анализа зарастања рана у областима третираним само скефолдом у поређењу са третманом скефолда са ципрофлоксацином или гентамицином. Б) Репрезентативне слике Х&Е бојења парафинских делова негативне, позитивне контроле након третмана скефолдима без и са инкорпорираним ципрофлоксацином и гентамицином. SG: PCL/PEG скефолд, CSG: PCL/PEG скефолд са инкорпорираним ципрофлоксацином GSG: PCL/PEG скефолд са инкорпорисаним гентамицином. Ed: епидермис, Bm: Базална мембрана, De: дермис, F: фоликули длаке,	

S: лојна жлезда, C: колагена влакна, B: крвни суд, H: хиподермис, M: мишићна влакна, * област опекотина.....	75
Слика 36. Механизам реакције умрежавања желатина глутаралдехидом	77
Слика 37. Стабилност умрежених скефолда желатина у PBS раствору. а) желатин б) желатин/0.1% ципрофлоксацин, в) желатин/0.1% гентамицин.....	78
Слика 38. рН евалуација скефолда након 24 и 72 сата у медијуму; А1– желатин без антибиотика, А2 – желатин/0,1% ципрофлоксацин и А3 – желатин/0,1% гентамицин скефолди; Б1, Б2, Б3 – Контролни медијум	79
Слика 39. SEM слике и дистрибуција пречника влакана А1- влакна желатина без антибиотика, А2 – желатина/0.1% ципрофлоксацина, А3 – желатина/0.1% гентамицина	81
Слика 40. Влакна желатина пре умрежавања (а) и GA-умрежена влакна желатина (б).83	
Слика 41. FTIR спектри прашкастог агенса гентамицин сулфата (а), ципрофлоксацин хидрохлорида (б), влакана желатина (в), желатин/0.1% гентамицин влакана (г) и желатин/0.1% ципрофлоксацин влакана (д).....	84
Слика 42. Елементарно мапирање и EDS спектри влакана желатина: а) без антибиотика, б) са 0.1% ципрофлоксацина, в) са 0.1% гентамицина.....	85
Слика 43. Дијаграм апсорпције воде скефолда желатина са и без антибиотика током 7 дана инкубације у PBS-у (рН 7,4, 37 °C). Подаци су приказани као средња вредност ± SD за дупле експерименте. * Представља статистичку значајност од узорка желатина/0.1% гентамицин, $p < 0.05$	86
Слика 44. Профил разградње скефолда желатина са и без антибиотика током 21 дана инкубације у PBS-у (рН 7.4, 37 °C). Подаци су приказани као средња вредност ± SD за дупле експерименте. * Представља статистичку значајност од желатин/0.1% гентамицина, $p < 0.05$	88
Слика 45. Резултати теста цитотоксичности на MRC-5 ћелијској линији након третмана чистим желатином и желатин/0.1% ципрофлоксацин и желатин/0.1% гентамицин скефолдима након 24 и 72 сата.....	89
Слика 46. Утицај третмана синтетисаних скефолда на а) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 - желатин/0.1% гентамицин скефолд б) <i>S. aureus</i> ATCC 25923 - желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолд в) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 - желатин/0.1% гентамицин скефолд и г) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853- желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолд	91
Слика 47. Утицај третмана филтер папира са импрегнираним антибиотикима на: а) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 – филтер папир/гентамицин 1mg/mL б) <i>S. aureus</i> ATCC 25923 – филтер папир/ципрофлоксацин 1mg/mL в) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 – филтер папир/гентамицин 1mg/mL и г) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 - филтер папир/ципрофлоксацин 1mg/mL.....	91
Слика 48. Проценат новонасталих крвних судова у подручјима третираним скефолдима: а) контрола б) желатин в) желатин/0.1% ципрофлоксацин г) желатин/0.1% гентамицин. * Означава статистичку значајност у односу на контролу при $p < 0.05$	93
Слика 49. Резултати процеса зарастања рана након третмана скефолдима желатина у <i>in</i> <i>vivo</i> условима. А) Репрезентативне микрографије Х&Е бојења делова негативне и позитивне контроле, као и узорка третираних скефолдима са инкорпорираним ципрофлоксацином и гентамицином (оригинално увећање x10). Означено: Ed – епидермис, Bm – базална мембрана, De – дермис, F – фоликули длаке, S – лојна жлезда, C – колагена влакна, H – хиподермис, * – област опекотине.....	95

Слика 50. Микрографије влакана хитозана/PLA добијене помоћу оптичког микроскопа и дистрибуција пречника влакана у зависности од концентрације раствора	98
Слика 51. SEM слике и дистрибуција пречника влакана: A1- хитозан/PLA нановлакна без антибиотика, A2 – хитозан/PLA/0.1% гентамицин, A3 – хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин.....	99
Слика 52. FTIR спектри прашкастог агенса гентамицин сулфата (а), ципрофлоксацин хидрохлорида (б) хитозана (в) PLA (г) хитозан/PLA (д) хитозан/ PLA/0.1% гентамицин (ђ), и е) хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин влакана	100
Слика 53. Дијаграм апсорпције воде узорка хитозан/PLA, хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацина и хитозан/PLA/0.1% гентамицина влакана током 7 дана инкубације у PBS-у (pH = 7.4, 37 °C). Подаци су приказани као средња вредност ± SD за дупле експерименте. * Представља статистичку значајност од желатин/0.1% гентамицин узорка, p<0.05.....	102
Слика 54. Профил деградације хитозан/PLA, хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин и хитозан/PLA/0.1% гентамицин нановлакна током 21 дана инкубације у PBS-у (pH=7.4, 37 °C). Подаци су приказани као средња вредност ± SD за дупле експерименте. *Представља статистичку значајност у односу на желатин/0.1% гентамицин, p<0.05	103
Слика 55. Тест цитотоксичности на MRC-5 ћелијској линији услед третмана хитозан/PLA, хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацина и хитозан/PLA/0.1% гентамицина влакана након 24 и 72 сата	105
Слика 56. Пример антимикробног деловања хитозан/PLA/0.1% гентамицин влакана на: а) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 б) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	106
Слика 57. Пример антимикробног деловања хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин влакана на: а) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 б) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	107
Слика 58. Резултати процеса зарастања рана након третмана хитозан/PLA скефолдима у <i>in vivo</i> условима. А) Репрезентативне слике Х&Е бојења парафинских делова негативне, позитивне контроле и после третмана скефолдима са инкорпорисаним ципрофлоксацин и гентамицин антибиотским агенсима (оригинално увећање x10). Ed: епидермис, Bm: Базална мембрана, De: дермис, F: фоликули длаке, S: лојна жлезда, C: колагена влакна, H: хиподермис, * област опекотина	109

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 1. Утицај параметара процеса и раствора полимера на морфологију влакана	8
Табела 2. Најчешће коришћени растварачи у процесу електроспининга.	23
Табела 3. Формулације раствора полимера коришћених у овом истраживању.	40
Табела 4. Параметри процеса електроспининга и средња вредност пречника влакана пре процеса умрежавања.	50
Табела 5. Хемијски састав и дистрибуција пречника влакана иницијално синтетисане серије од 14 полимерних комбинација	56
Табела 6. AI модел екстерне експерименталне валидационе серије полимера	56
Табела 7. Концентрације раствора полимера и пречник резултујућих влакана	59
Табела 8. Улазни подаци за екстерно тестирање и валидацију ANN мреже	64
Табела 9. Пречник зоне раста инхибиције	69
Табела 10. Резултати анализе пречника зона инхибиције испитиваних материјала методом–диск дифузије за тестиране бактеријске сојеве	90
Табела 11. Пречник инхибиције раста тестираних материјала	107

СПИСАК ШЕМА

Шема 1. Комбинације полимера и растварача за процес електроспининга. Полимери су растворени у масеним концентрацијама од 17 до 28% у CHCl_3 или комбинацији растварача CHCl_3 и DMF.	42
---	----

1. УВОД

1.1 Нановлакна у ткивном инжењерингу

Област нанотехнологија је у последњој деценији постала једна од најдинамичнијих подручја истраживања са значајним интересовањем научне заједнице за наноматеријале. Повећана пажња усмерена на наноматеријале произилази из разноврсности њихове примене у бројним областима. (1) Међу вештачким материјалима, нановлакна су у фокусу нанотехнологије због својих јединствених карактеристика, као што су ниска густина, висок однос површине и тежине, висока порозност и могућност контроле механичких карактеристика. Такве особине нановлакна их чине посебно погодним за примену у технолошким и биомедицинским областима. (2), (3). Откривено је да нановлакна могу да имитирају структуру, хемијски састав и механичка својства екстрацелуларног матрикса (енгл. *ECM - Extracellular matrix*). (2) Захваљујући томе, нановлакна или тзв. скефолди направљени од нановлакна, представљају атрактиван материјал у области биомедицине, укључујући сегменте ткивног инжењеринга који обухвата регенерацију костију, зарастање рана, као и системе за контролисану испоруку лекова.

Електроспининг представља једну од најперспективнијих технологија за добијање нановлакна због своје лакоће и континуираности процеса, високог капацитета производње и могућности оптимизације параметара процеса за циљем добијања влакана жељених особина. (4) Ова метода подразумева примену високонапонског електричног поља под чијим утицајем долази до стварања ултратанких влакана из раствора полимера који пролази кроз иглу милиметарског пречника. Процес електроспининга је базиран на параметрима раствора полимера (нпр. концентрација, проводљивост, површински напон), и процеса (нпр. јачина примењеног електричног поља, проток раствора, пречник игле и растојање између игле и колектора). Променом ових параметара могуће је утицати на морфологију, величину и облик нановлакна, чиме се омогућава прецизна контрола својстава влакана у складу са захтевима циљаних примена. (5)

Контрола морфолошких и механичких својстава као што су пречник влакана, порозност, морфологија и топографија површине, су од кључног значаја за примену у области биомедицине. Ова својства директно утичу на адхезију, пролиферацију, диференцијацију и раст ћелија на влакнима, уколико говоримо о биолошким анализама. Због тога је неопходно детаљно проучити морфолошка, хемијска, физичка и механичка својства материјала у *in vitro* условима, пре његове примене у *in vivo* условима, а касније у људском организму. (6) Нановлакна морају бити усклађена са својствима ткива или органа на месту имплантације, јер њихова својства утичу на функционалност финалних имплантабилних производа. Поред тога, морфологија влакана и њихова интеракција са култивисаним ћелијама одређују биокомпатибилност ових материјала.

У овом истраживању карактеристике синтетисаних влакана, укључујући морфологију, деградабилна и апсорпциона својства, микромеханичке особине и биокомпатибилност, биће детаљно анализирани и оптимизовани са циљем да се добијени материјали примене као завоји за ефикасно зарастање и регенерацију рана.

Истраживање у оквиру ове тезе организовано је у пет међусобно повезаних целина:

1. Одабир, оптимизација састава раствора полимера и процеса електроспининга

У првој целини ове докторске дисертације истражује се састав полимерних раствора, који представљају почетни и најбитнији корак у синтези нановлакна различитих група полимера. Полимери обухваћени овим истраживањем су класификовани у три главне групе: (а) синтетички (б) природни протеински и (в) природни полисахариди. Све три групе полимера, тј. добијених скефолда су анализирани, оптимизовани и модификовани.

Оптимизација параметара хемијског састава раствора полимера као и процеса електроспининга је кључни корак за успешну синтезу нановлакна различитих морфологија и пречника. Добијене морфологије укључују различите варијације међу којима су порозна, перласта, тракаста, спирална, храпава и глатка влакна. Варијације морфолошких типова влакана омогућавају широку примену, укључујући инжењеринг ткива, испоруку лекова, филтере за ваздух и воду и електромеханичке уређаје. Међутим, у овом истраживању, изабране су најпогодније комбинације раствора полимера код којих је морфологија влакана била погодна за циљану примену у регенерацији и зарастању рана.

2. Морфолошка карактеризација добијених нановлакна

Морфолошка карактеризација добијених нановлакна је анализирана помоћу светлосног оптичког и електронског скенирајућег микроскопа (енгл. *SEM – Scanning Electron Microscopy*). Добијање танких влакана, правилан распоред пора као и релативно велика специфична површина електроспинованих влакана значајно утичу на понашање материјала у контакту са ћелијама и живим ткивима. Са циљем да се докаже биокомпатибилност и адхезија ћелија унутар пора нановлакна, први синтетисани скефолди, поликапролактон:полиетилен гликол (PCL:PEG), у овом истраживању су били засејани матичним мезенхималним адипозним ћелијама (енгл. *ADMSC – Adipose-derived mesenchymal stem cells*) и анализирани помоћу SEM микроскопије.

3. Предвиђање параметара коришћењем модела вештачке интелигенције (AI)

Комбиновањем полимера PCL:PEG у различитим концентрационим и запреминским односима, у хлороформу (CHCl_3) и диметилформамиду (DMF), добијено је 125 јединствених комбинација раствора полимера. На основу ових комбинација раствора синтетисана су електроспинована влакна, која су анализирана помоћу структурне и механичке карактеризације користећи напредне микроскопске технике. Анализа је обухватала одређивање хемијског састава, као и морфолошких особина добијених влакана.

Прикупљени подаци су коришћени за обуку модела базираног на вештачким неуронским мрежама, чиме је развијен алгоритам за предикцију оптималних параметара синтетисаних скефолда. На основу предиктивних могућности модела вештачке интелигенције (енгл. *AI – Artificial intelligence*) и потврђених експерименталних резултата, идентификована је комбинација параметара која је остварила највећи Пирсонов коефицијент корелације при циљној вредности пречника влакана од 500 nm, и као таква је одабрана као најпогоднија за даља испитивања

4. Микромеханичка деформација и спектроскопска анализа скефолда

Механичка својства нановлакна представљају кључни фактор за њихову примену. У овом делу, истражује се утицај пречника влакана на механичка својства. Варијације у вредностима пречника имају велики утицај на даље понашање

нановлакна, нарочито у биолошкој анализи. Литературни подаци говоре да смањење пречника влакана, до којег долази у току процеса електроспининга, побољшава механичке карактеристике материјала. Као пример кртог скефолда, изабрани су представници синтетичке класе полимера (PCL:PEG), а понашање таквог скефолда при микромеханичкој деформацији анализирано је коришћењем *in situ* технике током снимања микроскопијом атомских сила (енгл. *AFM – Atomic force microscopy*).

Спектроскопска анализа хемијске структуре природних полимера у овом истраживању (желатина и хитозана) је извршена помоћу инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (енгл. *FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy*), ради утврђивања исправне хемијске структуре полимерних влакана, као и додатих антибиотских агенаса унутар скефолда (у овом истраживању коришћени антибиотски агенси су - ципрофлоксацин хидрохлорид и гентамицин сулфат).

5. *In vitro* и *in vivo* биолошка анализа биомиметичких нановлакна

Као резултат претходних експеримената, добијене су три групе скефолда. За потребе испитивања њихових физичко-хемијских и биолошких особина, коришћене су методе цитотоксичности, микробиолошке активности, рН вредности, укључујући испитивање степена деградабилности, апсорпције течности, као и способности утицаја на зарастање рана у *in vitro* условима.

Са друге стране, *in vivo* анализе на моделима животиња су биле следећи корак за утврђивање добијених резултата у *in vivo* условима. САМ есеј (енгл. *SAM – Chorioallantoic membrane*) на кокошјим јајима са циљем испитивања ангиогених способности влакана, као и потенцијал третмана на процес зарастања и регенерације рана на кожи на моделима Wistar albino пацова.

6. Двослојна хидрофилна/хидрофобна нановлакна за инжењеринг кожног ткива

Циљ последње целине истраживања је развој двослојних скефолда који опонашају ЕСМ коже (енгл. *ECM – Extracellular matrix*). Различити односи хидрофилних и хидрофобних компоненти, у овом истраживању су то комбинација природног хитозана и синтетичке поли(лактидне) киселине (PLA), омогућују добијање материјала са значајно унапређеним особинама. Оптимизација раствора хитозана који појединачно не може бити искоришћен за добијање нановлакна је спроведена кроз додаток хидрофобног синтетичког PLA полимера, при чему се омогућава успешна синтеза и добијање скефолда са одговарајућим карактеристикама.

Овако структуриране целине заједно чине свеобухватно истраживање које има за циљ добијање различитих класа материјала са супериорним особинама и могућношћу примене у савременим биомедицинским технологијама.

1.2 Електроспининг: Технологија за синтезу нановлакна

1.2.1 Еволуција електроспининга: Историјски развој и принципи

Влакна у природи су присутна у облику дугих филамената или ланчаних издужених структура. Пауци више од 140 милиона година користе свилене мреже влакана пречника од 2 до 5 μm за хватање плена, док свилене бубе производе филаменте изузетних механичких особина. (7) Природни примери су инспирисали савремену технологију да се позабави развојем вештачких влакана, која су од праисторије била неизоставан део људског живота. (8) Према историјским подацима, први остаци памучних тканина датирају из 5000. године п.н.е., а култивација свилене бубе започела је око 2700. године п.н.е. са сврхом производње свиле. Индустријализација текстилне производње значајно је унапређена са појавом вретена око 1300. године, док је 1880-их година почела да се развија модерна текстилна индустрија. (9)

Прва вештачка влакна су добијена од целулозе и представљена су 1891. године, али су тек 1911. ушла у комерцијалну употребу. Синтетичка влакна, попут најлона, који је 1938. године развила компанија DuPont, драстично су трансформисала текстилну индустрију, значајно смањујући зависност од природних влакана. (10) У наредним деценијама, различити полимери, укључујући полиестере, почели су да се користе за производњу синтетичких влакана. (11) Методе производње попут модификованог предења, омогућиле су контролу својстава добијених влакана. (12) Међутим, ове методе углавном производе влакна пречника у опсегу 10–100 μm , што ограничава њихову примену у областима које захтевају фине нано-структуре.

Концепт процеса електроспининга је замишљен још у ранијој студији коју је спровео Вилијам Гилберт 1600. године, у којој је посматрао формирање капљице воде у облику конуса у присуству електричног поља. (13) Само један век касније, Стивен Греј је приметио електрохидродинамичку атомизацију капљице воде из које је настајао веома фини млаз. Француски физичар Жан Антоан Ноле је 1747. године извео познати експеримент процеса електрораспршивања, где је показао да се вода може распршити као аеросол када прође кроз електростатички наелектрисан суд. Лорд Рејли је затим проучавао понашање наелектрисаних капљица, и 1882. године је теоретски проценио максималну количину наелектривања коју кап течности може да носи пре него што млаз течности нестане са површине. (14) Електроспининг се може сматрати варијантом тзв. технике електрораспршивања при чему се код оба процеса примењује извор високог напона на раствор течности. (15) Главне разлике између процеса електроспиновања и електрораспршивања леже у вискозности и вискоеластичности течности, а тиме и у понашању млаза. (16) Током електроспининга, млаз се може држати у непрекидном облику да би произвео влакна уместо да се разбије на капљице (за формирање честица), као код процеса електрораспршивања. Чарлс В. Бојс је 1887. године показао да вискоеластична течност у присуству електричног поља може формирати влакна. (17) Овакво откриће је поставило темељ за развој технике електроспининга, која је добила значајан замах тек у 20. веку.

Основни принцип електроспининга базира се на примени високог електричног напона на млаз течности, који се услед електростатичких сила солидификује у ултратанка влакна. Прелаз сферне капљице у конус под утицајем електричног поља представља кључни корак у процесу. (18) Када млаз капљице достигне тзв. потенцијал распршивања, овакав процес пружа континуалну производњу влакана пречника у распону од десетина нанометара до неколико микрометара. (19) Према подацима из литературе, забелжена су нановлакна са пречником у распону од 1 nm, а у појединим случајевима и мањим од 1 nm. (20)

Историјски развој електроспининг технологије укључује неколико кључних прекретница. Патенти Џона Кулија и Вилијама Мортонa из 1902. године су описали основне прототипове апарата за електроспининг. (21) Антон Формхалс је 1930-их година радио на усавршавању опреме за процес електроспининга у комерцијалне сврхе. Електроспинована нановлакна су први пут примењена у Совјетском Савезу 1938. године за развој ваздушних филтера, познатих као „Петрјанов филтери“ за хватање честица аеросола. (22) Филтери су постали популарни и комерцијализација је довела до оснивања фабрике у Тверу за производњу филтера за дим на бази нановлакана. (22) Током овог временског периода, полако се развијало механичко разумевање процеса. Крајем 1960-тих година Тејлор је објавио серију радова, где је описивао математички модел промене облика капљице из сферног у конусни под утицајем јаког електричног поља. (23) Овај карактеристичан облик сада се у литератури дефинише као Тејлоров конус.

У периоду од 1970. године, развој технике електроспиновања доживео је 20 година стагнације. Ова стагнација се у великој мери може приписати недостатку технике за карактеризацију. Ипак, током овог временског периода се развијају идеје за различите области примене за електроспинована влакна, укључујући њихову потенцијалну употребу као материјала за зарастање рана, као што је описано у патенту из 1977. године. (24) Почетком 1980-их година компанија Donaldson Co. Inc., је почела да производи и продаје филтере од електроспинованих влакана за пречишћавање ваздуха. (22)

Са појавом савремених електронских микроскопа, групе које су предводили Дарел Ренекер и Грегори Рутлиц су наставиле истраживање и развој процеса електроспиновања. (25) Резултати њихових истраживања су показали да се многи органски полимери могу успешно користити за процес електроспиновања са циљем добијања финих влакана у нанометарском опсегу. Тиме је техника електроспиновања постала јединствен начин за производњу дугих и континуираних влакана.

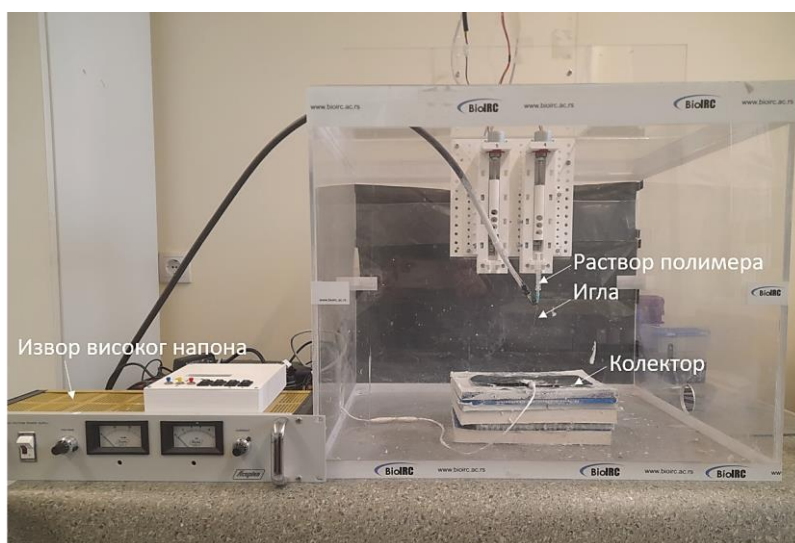
Почетком 21. века техника електроспиновања је почела да добија све већу пажњу са увођењем новијих формулација за добијање композитних и керамичких влакана. (26), (27) Могућност електроспиновања нових материјала брзо је омогућила нове примене у различитим областима. Такође, развијене су и нове стратегије за контролу структуре електроспинованих влакана путем оптимизације параметара средине и процеса, отварајући могућности примене у енергетским и биомедицинским областима. Нешто касније, 2004. године у Чешкој, група научника предвођена научником Јирсаком је развила и патентирала уређај за електроспиновање са ротирајућом електродом. (28) Технологија је патентирана под називом Nanospider™ без присуства таквих елемената као игла, колектор и ротор. Nanospider™ технологија омогућава производњу нановлакна од раствора полимера, и погодан је за производњу органских влакана високог квалитета. Ова свестрана технологија се лако прилагођава разним параметрима процеса у циљу оптимизације специфичних својстава произведених влакана. (29)

Данас су бројне компаније дизајнирале и имплементирале индустријске производне линије за синтезу влакана у великим количинама, омогућавајући њихову комерцијализацију. Тренутно су електроспинована влакна најпопуларнија за примене у индустријским областима у облику различитих филтера за пречишћавање воде, ваздуха и мн.др. Са прихватањем ознаке Conformite European (CE) за васкуларни трансплантат од Nicast-a, све више и више биомедицинских производа заснованих на електроспинованим влакнима је одобрено за клиничку употребу. (30) У међувремену, у лабораторијским условима синтетисана влакна су додатно дизајнирана са специфичним саставима и иновативним структурама, пружајући посебне функције за иновативне примене. Ова достигнућа чине процес електроспиновања свестраном и одрживом технологијом за производњу материјала на бази влакана за широк спектар примена.

1.2.2 Основе процеса електроспининга

Да би се описао процес електроспининга потребно је дефинисати основне саставне делове уређаја за електроспининг.

Уређај за процес електроспининга се састоји од извора напајања за довод напона са позитивним или негативним поларитетом, игле која је спојена са шприцом који служи као резервоар за раствор и проводљиве равне плоче или ротирајућег бубња који служи као колектор (Слика 1). Раствор полимера се налази у шприцу, применом одређене одговарајуће брзине протока раствор се креће кроз шприц у иглу, где на крају отвора игле почиње да се појављује кап. Кап раствора одржава његов површински напон, и када се електрични потенцијал примени између игле и колектора, односно на млаз течности, површина течности се наелектрише и деформише у конусни облик (*Тејлоров конус*). (31) Ово се дешава због равнотеже електричних сила и површинског напона раствора полимера. Када интензитет електричног поља превазиђе критичну вредност, електростатичка сила ће повећати електрично одбијање између међусобних наелектрисања на површини капи. Самим тим, електростатичке силе ће превазићи површински напон раствора полимера, при чему ће се формирати наелектрисани млаз у облику конуса. У међувремену, растварач почиње да испарава што дозвољава да се млаз распрши и исталожи у облику влакана на колектору. (32)



Слика 1. Приказ уређаја за електроспининг у лабораторији за биоинжењеринг

У току процеса електроспиновања, јављају се три главне фазе у формирању млаза раствора. Први је формирање Тејлоровог конуса, затим, линеарно кретање млаза према колектору (стабилан регион) и природа добијених влакана из млаза раствора. Током процеса, након неког одређеног времена долази до нестабилности “распршивања” млаза због великих електростатичких сила на површини млаза. Нестабилност тзв. распршивања је област у којој се млаз савија и губи стабилан облик због великог електростатичког поља. (33) Појам “нестабилност савијања” је описао сер Г. И. Тејлор 1964. године. (22) Стабилан облик јавља се само у равнотежи између електростатичких сила и површинског напона капљице. Повећање електричног потенцијала доводи до изобличења стабилног облика Тејлоровог конуса са половином угла од 49.3° .

Наелектрисани млаз полимера се растеже под утицајем електричног поља, савија се и достиже електроду (колектор). Као резултат се добијају ултрафина влакна исталожена на колектору.

У литератури постоје три различите врсте нестабилности млаза течности:

1. Рејлијев појам нестабилности који описује распршивање млаза на капљице микронске величине
2. Осносиметрична нестабилност проводљивости у којој млаз даје структуру влакана у облику перли, тј. влакана са дефектима. Нестабилност савијања је битна у процесу електроспиновања јер је одговорна да издужи млаз. (34)
3. Тејлоров појам нестабилности. Нестабилност савијања наелектрисаног млаза настаје услед међусобних одбојних сила електричног наелектрисања који се преноси млазом. Може се дефинисати као област у којој се млаз савија и истеже услед великих електростатичких сила на површини млаза. (35)

1.2.3 Формирање Тејлоровог конуса

Тејлоров конус се развија на врху капиларе када су електростатичке силе веће од силе површинског напона и онда долази до избацивања млаза раствора са површине капиларе. Молекулска маса полимера, дужина и структура ланца, као и растварач који се користи током експеримента, одређују да ли ће млаз формирати континуирана влакна или ће се распршити у капљице. Неке студије су забележиле да се глатка влакна стварају када је Беријев број, $Be = \eta c$, што је мера унутрашњег вискозитета полимера (η) и концентрација полимера (c), већи од одређене критичне вредности Be_{cr} , што је карактеристично за полимер. (36) (19) Специфични вискозитет полимерног раствора се израчунава коришћењем односа:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_o - \eta_s}{\eta_s} \quad (1)$$

- (1) где је η_s вискозитет растварача
- (2) где је η_o вискозитет раствора полимера при нултом смицању за одређену концентрацију (c)
- (3) Интринзична вискозност η полимера се посматра као линеарна екстраполација специфичног вискозитета η_{sp} израчуната за различите концентрације и концентрације $c = 0$

Интринзична вискозност η такође може бити у корелацији са молекулском масом полимера (MW) преко Марк-Хувинкове једначине:

$$\eta = KMw^\alpha \quad (2)$$

Константе K и α зависе од полимера, температуре и растварача.

Под дејством примењеног електричног поља, када се вишак наелектрисања преноси на течност или од течности, анјони и катјони нису равномерно распоређени. Слободна површина раствора је увек еквипотенцијалне површине, што значи да поседује тако распоређено наелектрисање да одржава нулто електрично поље унутар течности.

Да би се мало детаљиније представио феномен настајања Тејлоровог конуса, као пример се може узети оносиметрично течнo тело, које има електрични потенцијал ($\varphi_0 + \text{const.}$) на свом врху и налази се на одређеној удаљености од еквипотенцијалне равни (a_0). Расподела електричног потенцијала је једнака $\Phi = \varphi + \text{const}$ и испитује се у сферним координатама R (удаљеност од центра) и θ (угао у односу на осу) и у цилиндричним координатама ρ (удаљеност од осе) и z (висина). Када је облик слободне површине у равнотежи, сила површинског напона је уравнотежена електричним силама које делују на капљицу. Претпоставка треба да задовољи Лапласову једначину, што омогућава проналажење функције облика површине (Ψ). (37) Дакле:

$$\Psi(\theta) = P_{1/2}(\cos\theta) \quad (3)$$

где је $P_{1/2}(\cos\theta)$ Легендјева функција полуреда. (15) Слободна површина може имати еквипотенцијал само када угао θ одговара нули од $P_{1/2}(\cos\theta)$ у опсегу $0 \leq \theta \leq \pi$, што је $\theta_0 = 130.7^\circ$. Капљица на врху игле представља конус са половицим углом на његовом врху који је једнак $\alpha = \alpha_T = \pi - \theta_0 = 49.3^\circ$, који се дефинише као Тејлоров конус, где α представља угао између осе и површине конуса. Облик капљице асимптотски се приближава Тејлоровом конусу као радијус који тежи ка бесконачности ($R \rightarrow \infty$). (36) Самим тиме, када електрично поље делује на капљицу проводне течности, површина се деформише и тежи да поприми облик Тејлоровог конуса под полууглом од 49.3° , јер је тај облик уравнотежен између електростатичких и површинских сила. Геометрија затим произилази директно из математичких решења Лапласове једначине и појаве нуле Легендјеве функције полуреда.

1.3 Оптимизација услова и параметара процеса

Морфологија и пречник влакана зависе од параметара процеса који се деле на основна својства раствора (нпр. врста полимера, концентрација раствора, проводљивост, површински напон растварача) и услове рада (нпр. јачина примењеног електричног поља, температура и влажност средине, растојање од игле до колектора и проток). Разумевање формирања морфологије влакана је неопходно за прецизну контролу својстава скефолда. Са тим циљем, научне студије су испитале утицај различитих параметара процеса и раствора на морфологију влакана (Табела 1).

Табела 1. Утицај параметара процеса и раствора полимера на морфологију влакана

Параметар	Утицај на морфологију влакана
	Повећање примењеног напона утиче на:
Примењен напон	Стварање перлица у структури влакана (38)
	Смањење пречника влакана (39), (40)
Растојање од игле до колектора	Повећање растојања до колектора утиче на:
	Смањење пречника влакана (41), (42)
Проток раствора	Повећање протока утиче на:
	Смањење влажности влакана (43)

Молекулска маса полимера	Повећање молекулске масе полимера утиче на: Повећање перлица (44)
Концентрација полимера	Повећање концентрације раствора утиче на: Смањење перлица у структури влакана (38) Повећање пречника влакана (39), (33) Повећање електричне проводљивости уз додатак соли раствору утиче на: Структуру влакана, резултујући морфолошки исправним влакнима без дефеката (45),(46)
Електрична проводљивост раствора	Смањење пречника влакана (47), (48) Повећање диелектричне константе раствора води ка смањењу појаве перлица (49), (50)
Диелектрична константа раствора	

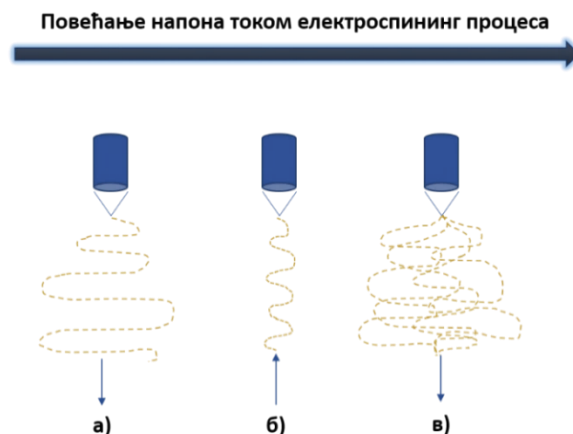
У наставку је дато кратко појашњење за сваки параметар.

1.3.1 Параметри процеса

1.3.1.1 Напон

Примењени напон утиче на силу одбијања електростатичког набоја и укупно примењено електрично поље. (51) Повећање примењеног напона може довести до стварања перлица, односно до повећаног ризика од настанка дефеката у структури влакана. (39)

На **Слици 2** је приказан утицај примењеног напона на формирање влакана. Са повећањем напона, млаз полимерног раствора се понаша на неколико начина у зависности од хемијског састава раствора, параметара раствора и процеса. У неким случајевима, може се створити само један млаз током процеса електроспиновања, док ће раствори одговарајуће вискозности са повећањем напона дати више млазева. Стварање више млазева има за последицу бољу распршеност и структуру добијених влакана. Такође, превелика вискозност раствора доводи до тога да се млаз раствора истеже и не формира влакна. Оптимална вредност напона зависи од карактеристика употребљеног раствора полимера и жељених својстава влакана, и најчешће се одређује експерименталним путем.



Слика 2. Зависност облика млаза раствора полимера од примењеног напона а) стварање и ширење једног млаза раствора б) истезање млаза раствора в) више млазева одједном

1.3.1.2 Растојање

Удаљеност од врха игле до колектора одређује време за које ће млаз раствора доспети до колектора. Веће растојање пружа више времена за испаравање растварача, али и утиче на смањење пречника влакана и влажност добијених скефолда. (52), (53) У неким експерименталним истраживањима, где су била коришћена растојања мања и већа од 10 cm, утврђено је да је на краћим растојањима добијени пречник влакана био већи и морфологија влакана грубља, јер млаз не буде довољно разређен пре него што се исталожи. Како је хлађење влакна неопходно за очвршћавање, краће растојање од игле до колектора може довести до таложења благо влажних влакана, који нису адекватно подвргнута процесу солидификације. На растојањима већим од 10 cm, пречник добијених влакана је био знатно мањи јер млаз раствора је имао довољну путању, односно период времена за солидификацију и правилно распршивање. (54)

Битно је напоменути, да врста колектора такође игра велику улогу у морфологији насталих влакана. Утврђено је да је квалитет влакана прикупљених на алуминијумском колектору био много бољи од влакана прикупљених на другим предметима. (55)

1.3.1.3 Проток

Проток се подешава на пумпи која је у склопу са електроспининг системом. Проток може утицати на величину суспендоване капљице на врху игле. Повећање протока може довести до повећане влажности влакана и повећаног формирања дефеката у структури влакана. (56)

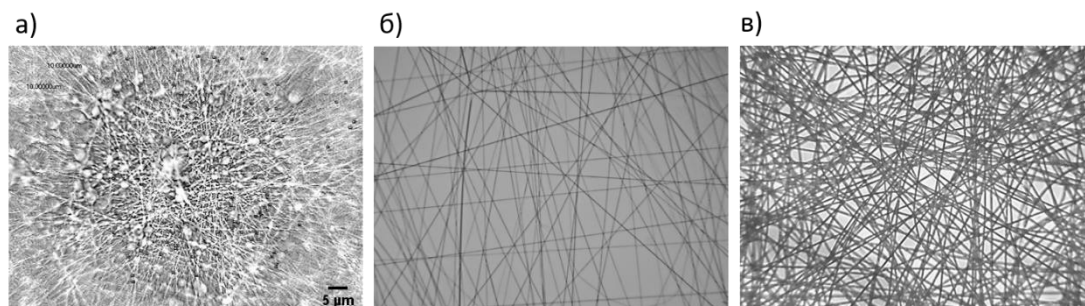
Проток раствора полимера кроз врх игле диктира морфологију влакна. Критична вредност варира у зависности од полимерног система. Повећање протока изнад критичне вредности може довести до стварања дефеката у структури влакана, тзв. перли. На пример, у случају раствора полистирена, када је проток повећана на 0.10 mL/min, примећено је формирање перлица у морфологији. Међутим, када је проток смањен на 0.07 mL/min, формирала су се влакна без перли. (29) Повећање протока изнад критичне вредности доводи до повећања величине пора и пречника влакана, као и до формирања дефектних особина у морфологији. (56) При већем протоку млаз нема времена да солидификује, самим тим се исталожи у влажном облику. Повећање и смањење брзине

протока утиче на формирање влакана и њихов пречник, пожељан је минимални проток да би се одржала равнотежа између излазног раствора и млаза који се распршује под утицајем електростатичког поља. Одржавање овакве равнотеже, гарантује формирање стабилног млаза, односно формирање конусног облика капљице раствора и смањује могућност настајање издуженог млаза. Издужени млазови нису стабилни, а током процеса електроспиновања, они се непрекидно смењују конусним млазевима. Као резултат овог феномена, формирају се влакна са широким опсегом пречника и неадекватном морфологијом.

1.3.2 Параметри раствора полимера

1.3.2.1 Молекулска маса

Молекулска маса коришћених полимера је још један важан параметар који утиче на морфологију влакана, вискозност, површински напон и проводљивост раствора. (36) Молекулска маса одражава оријентацију полимерних ланаца у растворима, односно вискозитет раствора. (57) Због тога се полимери релативно велике молекулске масе обично користе за производњу влакана јер нуде одговарајући вискозитет. Откривено је да повећање молекулске масе полимера изазива варијације у морфологији влакана, као што је смањење броја перли и структуре неправилног облика, али такође повећава и величину пора. Раствори релативно мале молекулске масе обично резултирају стварањем перлица у морфологији влакана. (58) Структуре влакана различитих молекулских маса (од релативно малих до већих) могу се видети на **Слици 3**.



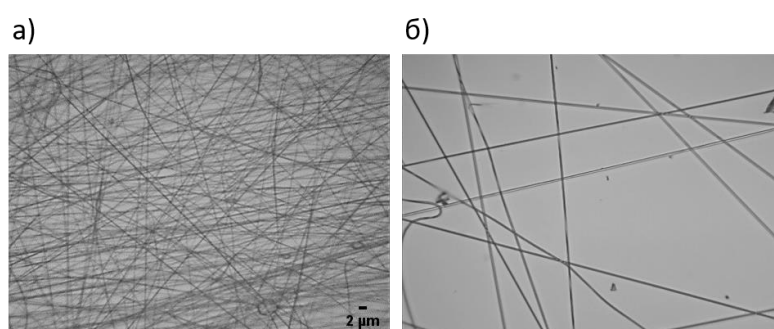
Слика 3. Различите структуре добијених влакана у зависности од молекулске масе полимера. а) релативно мала молекулска маса б) релативно средња молекулска маса, и в) релативно велика молекулска маса

1.3.2.2 Вискозитет/концентрација раствора

За успешан процес електроспиновања је потребна оптимална вискозност раствора. Обично се сматра да је вискозност раствора доминантан параметар који значајно утиче на пречник влакана и на то да ли ће се раствор уопште електроспиновати. Вискозност раствора полимера треба да се налази у одређеним опсезима, како би се омогућио процес формирања влакана. (59) Прениска вискозност раствора може довести до прекида стварања влакана, при чему долази до капљичастих структура, док превисок вискозитет онемогућава проток раствора полимера. Минимални захтевани праг вискозности одговара одређеној концентрацији полимера у раствору који се електроспинује и варира у зависности од молекулске масе полимера и природе коришћеног растварача. Концентрација раствора полимера и молекулска маса полимера су међусобно повезане, па се степен вискозности раствора може подесити променом

концентрације полимера у раствору. Различита вискозност раствора (релативно мала и велика вискозност) даје различите структуре влакана (**Слика 4**). (60) Опсег вискозности за различите растворе полимера је индивидуалан.

Када се повећа вискозитет раствора, долази до стварања полимерних перли, и што је просечно растојање између њих веће, пречник добијених влакана је већи. (61) До формирања таквих перли долази зато што се ток течности разбија на капљице, кад је вискозитет раствора висок. Како концентрација раствора расте, тако се повећава пречник резултованих влакана. Што је нижа концентрација полимера, то је мањи пречник, док је квантитативни однос између концентрације раствора полимера и пречника добијених влакана углавном променљив. Ипак, смањење концентрације раствора полимера није нужно услов за формирање влакана са мањим пречником јер параметри процеса електроспининга такође утичу на морфологију насталих влакана. (62)



Слика 4. Структуре добијених влакана са различитом вискозношћу раствора. а) раствор са релативно великом вискозношћу б) раствор са релативно малом вискозношћу

1.3.2.3 Проводљивост

Електрична проводљивост раствора је један од кључних фактора за успешно формирање влакана из раствора полимера. Електрична проводљивост дефинише електрично наелектрисање које се налази на површини раствора полимера и омогућава формирање влакана уз спречавање настајања капљица. Проводљивост раствора је углавном условљена избором растварача. (33) Приликом растварања полимера у растварачу, проводљивост раствора се повећава услед ослобађања јонских врста из структуре полимера. Међутим, са повећањем концентрације полимера у раствору, електрична проводљивост може да се смањи. (63) Ова појава се може десити услед вишка молекула полимера, што доводи до смањене покретљивости јона. Ако полимер поседује особине полиелектролита, онда ће проводљивост раствора бити много већа (у поређењу са растворима полимера слабе проводљивости) и значајно зависити од концентрације. (64) Повећање проводљивости неког раствора се може постићи додавањем електролита, неорганских соли или органских јонских једињења. (34) Додатак јонских соли не само да повећава проводљивост раствора, већ и утиче на морфолошке особине добијених влакана. Величина додатих јона може директно утицати на величину пречника влакана, јер мањи јони имају већу покретљивост и доводе до повећања електричног поља и стварања тањих, уједначенијих влакана. (13)

1.3.2.4 Диелектрична константа

Диелектрична константа представља меру способности раствора да се поларизује применом електричног поља. Она одржава способност растварача да се поларизује под утицајем електричног поља, а самим тиме утиче и на расподелу наелектрисања у раствору полимера током процеса електроспининга. Вредност диелектричне константе растварача одређује однос између електричног поља и млаза раствора, што утиче на вредност пречника и хомогеност влакана.

У литератури је описан низ истраживања која указују на повезаност диелектричне константе и својстава влакана. Према истраживањима Bhardwaj и Kundu (2010), поларност изабраног растварача утиче не само на стабилност млаза, већ и на интеракцију између молекула полимера у раствору, што директно утиче на морфолошка и механичка својства влакана. (65) Frenot и Chronakis (2003) истичу да избор растварача са одговарајућом диелектричном константном представља битан корак за даљу синтезу влакана са жељеним особинама. (66) Правилан избор или комбинација растварача омогућава не само контролу морфологије, већ и стабилност самог процеса и функционалност добијеног материјала.

1.3.3 Параметри средине

1.3.3.1 Утицај влажности на испаравање растварача

Као што је напоменуто, у току процеса електроспиновања долази до испаравања растварача у области млаза од игле до колектора. Раствор полимера пролази кроз три домена: а) Тејлоров конус б) прави млаз, и б) област савијања/распршивања. Како је релативна брзина ваздуха уз површину раствора полимера мала у Тејлоровом конусу, испаравање растварача се дешава кроз механизам дифузије унутар ова два региона. Међутим, у региону где долази до савијања млаза, испаравање се дешава дуж електроспиновоаног млаза за неколико десетина милисекунди конвекцијским механизмом услед распршивања. (67) У региону савијања и изламања долази до издужења млаза, стварања веће површине и струјања ваздуха већих брзина, чиме се подстиче ефикасно испаравање растварача са површине млаза. Корак испаравања је један од најбитнијих јер услед тога долази до таложења сувих нановлакна на колектору. (68)

Испаравање растварача брзине (m_{evap}) (млаз дужине испаравања $d\xi$) је повезано са варијацијама брзине протока млаза Q кроз биланс масе:

$$m_{\text{evap}} = -\rho dQ \quad (4)$$

где је ρ густина раствора. Директна веза између брзине испаравања (m_{evap}) и влажности током процеса је дата у следећој једначини: (30)

$$\dot{m}_{\text{evap}} = -\rho h_s [c_s, e_q (T) - c_{s\infty}] 2\pi R d\xi \quad (5)$$

где је h_s коефицијент преноса масе растварача, $c_s, e_q (T)$ је концентрација zasiћене паре растварача на температури T , $c_{s\infty}$, концентрација паре у атмосфери далеко од млаза, ξ дужина млаза, а R полупречник попречног пресека млаза на дужини млаза ξ .

У случају кад се као растварач користи чиста вода, и под претпоставком да су ваздух и пара идеални гас, разлика $[c_{s,e_q}(T) - c_{s\infty}]$ је пропорционална изразу $[1 - RH/100]$. Сходно томе, под овим претпоставкама уз примену емпиријског израза за коефицијент преноса масе водене паре, важи следећа једначина: (69)

$$\dot{m}_{\text{evap}} = 1.95 v_a^{\frac{1}{6}} D_a^{\frac{1}{2}} \rho_{\text{ваздуха}}^{\frac{1}{3}} R^{1/3} [1 - RH/100] d\xi \quad (6)$$

где је:

RH: релативна влажност

v_a : кинематички вискозитет ваздуха

D_a : брзина дифузије водене паре у ваздуху

$V_{\text{ваздуха}}$: релативна брзина ваздуха на површини млаза

Дакле, брзина испаравања зависи од врсте растварача, тј. да ли су водени или неводени растварачи. Када се користи неводени растварач, концентрација паре у околини млаза, $c_{s\infty}$, се занемарује (једнака је нули), што доводи до испаравања које зависи само од притиска засићене паре растварача. Међутим, у случају водених растварача, брзина испаравања зависи од концентрација водене паре у радној средини. Када је концентрација $c_{s\infty}$ близу концентрације засићене паре на температури T (тј., када разлика $c_{s,e_q}(T) - c_{s\infty}$ у једначини (5) је приближно једнака нули), испаравање је ограничено јер врло мала количина воде може испарити из млаза, пре него што дође до равнотеже. У таквим условима, испаравање млаза се одвија споро. Са друге стране, када је концентрација водене паре у ваздуху нижа од концентрација засићене паре, испаравање из млаза је знатно убрзано. (70)

Влажност такође утиче индиректно на брзину испаравања, као и на уклањање наелектрисања са површине млаза. (71) Иако се ваздух обично сматра изолационим гасом, под утицајем високих електричних потенцијала, постаје способан да спроводи струју захваљујући формирању јона у ваздуху. Као резултат, за било које врсте растварача, млаз делимично изгуби наелектрисање у контакту са околним јонизованим ваздухом. Са повећањем влажности, долази до појачане јонизације ваздуха због веће количине молекула водене паре у ваздуху. Молекули водене паре могу се лако јонизовати захваљујући њиховој ниској енергији јонизације у поређењу са другим врстама молекула присутним у ваздуху као што је азот. (72) При високој влажности полимерни млаз се још више диелектрише, и како се густина наелектрисања млаза смањује при високој влажности, смањује се и амплитуда распршивања, што успорава испаравање растварача. (73), (50)

1.3.3.2 Утицај влажности на квалитет влакана

Када се влакна таложе на колектору, јако је битно да очврсну захваљујући раздвајању фаза током процеса електроспининга. Раздвајање фаза се дешава када састав раствора прелази границу мешљивости која представља удео полимера и растварача. (74) Фазни дијаграми се могу користити за предвиђање границе мешања раствора и последичног раздвајања фаза. (75), (76), (77) Постоје два механизма која се јављају током фазног раздвајања: термички индуковано раздвајање фаза (енгл. *TIPS – Thermally Induced Phase Separation*) и одвајање фаза изазвано испаравањем (енгл. *VIPS – Vapour Induced Phase Separation*). (78), (79)

TIPS је механизам раздвајања фаза изазван брзим хлађењем хомогеног раствора полимера. У процесу електроспиновања, *TIPS* се може десити када се због испаравања растварача површина влакана солидификује. У том случају, граница растворљивости се снижава и раствор се може исталожити. Током процеса *VIPS*, долази до таложења полимера из раствора јер не долази до формирања влакана током процеса електроспиновања.

Влажност може утицати на брзину солидификације влакана, фаворизујући један од механизма раздвајања фаза. (50) Његов ефекат варира у зависности од природе полимера и растварача. Примећено је да влажност успорава испаравање растварача, ако је растварач вода или ако је растварач хидрофилне природе.

Хигроскопни полимери такође могу да апсорбују малу количину количине воде присутне у ваздуху. Као резултат тога, млаз може да се издужи и на тај начин одлаже солидификацију влакана и дозвољава млазу раствора да се више истеже током процеса. Када се користи хидрофобни полимер, влажност средине у којој се обавља експеримент такође утиче на крајњи резултат влакана. Велика влажност делује као нерастварач за такав полимер. Сходно томе, повећање влажности доводи до брже солидификације влакана. (68)

1.3.3.3 Температура

Температура околине поседује индиректан утицај на морфологију влакана и игра кључну улогу у процесу електроспининга, утичући на морфологију, пречник и квалитет добијених влакана. Битно је појединачно проценити густину раствора, дифузију паре, вискозитет, брзину испаравања растварача у зависности од температуре околине. Повећање температуре доводи до бржег испаравања растварача и смањења вискозитета, што често доводи до бржег очвршћавања влакана и смањења њиховог пречника. (73) Међутим, превисока температура може изазвати дефекте у влакнима, као што су неправилна геометрија структуре влакана и појава перлица. Истраживања су показала да оптимална контрола температуре околине доприноси стабилности процеса и квалитету добијених влакана. (80)

1.4 Типови морфологије влакана

Електроспининг технологија пружа могућност синтезе влакана различите структуре и морфологије уз оптимизацију параметара и услова рада. Морфологија нановлакна може се мењати уз промену параметара процеса електроспининга и на тај начин се прилагодити жељеној примени.

Издавају се неколико типова морфологија влакана:

а) Порозна влакна

Порозна влакна су у великој потражњи због широког спектра примене. (81) Главни механизам за формирање порозних влакана је фазно одвајање. Високо порозне структуре се могу формирати услед брзог одвајања фаза током процеса електроспиновања коришћењем веома испарљивог растварача. Што је испарљивији растварач, порозност ће бити већа због велике брзине испаравања током процеса. (82) Штавише, напон паре растварача има критичан утицај на процес формирања пора. Растварач са мањим напоном паре утиче на смањење формирања пора. (83) Порозна влакна могу се синтетисати центрифугирањем смеше два различита полимера. Један од полимера би се могао уклонити након формирања влакана селективним растварањем у растварачу у коме се налази други нерастворљиви полимер. (84), (85)

б) Разграната влакна

Због испаравања растварача и издужења млаза током електроспиновања, наелектрисање по јединици површине коју носи млаз се константно мења. При томе, облик млаза постаје нестабилан због разлике између површинског напона и електростатичких сила. (86) Ова нестабилност млаза смањује његово наелектрисање по јединици површине, тако што долази до раздвајањем на два или више мањих млазева. (82)

с) Тракаста влакна

Влакна налик тракама могу се добити од неколико полимера уз одређену обраду и оптимизацију услова. Механизам формирања тракастих влакана повезан је са напоном паре растварача, односно његовом брзином испаравања. (33) Као резултат, танак слој полимера ће се формирати на површини млаза, што ће резултирати танким слојем чврстог млаза са течним језгром. Кружни пресек постаје елиптичан, формирајући тракаста или спљоштена влакна. (87)

д) Хеликоидна влакна

Механизам настајања спиралних или тзв. хеликоидних влакана је анализиран од стране многих истраживача. (88) Електроспинована полимерна влакна поседују исто наелектрисање, и када се нађу дуж праве линије између њихових центара долази до међусобног одбијања. Као резултат, Кулонова сила елонгације се јавља дуж полимерног ланца. Кад се влакна изложе проводном окружењу, наелектрисање ће се преносити са једног полимерног ланца на други, при чему ће доћи до неравнотеже између високоеластичне силе стезања и Кулонове силе одбијања. (89) Влакна пролазе кроз структурно преуређење како би се успоставила равнотежа и спонтано уређење у спиралне структуре. Микро и нано спиралне структуре имају потенцијал за примену у многим областима укључујући електромеханичке уређаје, оптичке компоненте и испоруку лекова. (90)

е) Влакна са језгром

Са развојем релативно нове технике коаксијалног електроспиновања, влакна са језгром могу бити направљена од две различите полимерне компоненте. Различити полимерни раствори се посебно уносе у шприц коаксијалног положаја и електроспинују истовремено. Као и код конвенционалног електроспининга, раствор се подвргава одређеном напону, при чему се формира Тејлоров конус на врху капљице. Као резултат, добија се скефолд који се састоји од површинског омотача и унутрашњег језгра. (91) Коаксијално електроспиновање побољшава својства материјала за различите примене као што су микроелектроника, оптика и медицина. Поред тога, коаксијално електроспиновање нуди израду шупљих влакана и наноцеви користећи минерално уље као материјал за језгро и полимер или керамику као омотача материјала. Након електроспиновања, минерално уље се уклања са влакана или наноцеви.

f) Влакна са перлама

Формирање перли током процеса електроспининга смањује велику површину по јединици масе добијених влакана. Због тога се перле сматрају дефектом у току процеса. Механизам формирања перлица је повезан са вискозитетом, површинским напонам раствора полимера, и густином наелектрисања коју носи полимерни млаз. Међутим, главни разлог формирања перлица је неравнотежа између површинског напона и вискоеластичне силе. (92) Површински напон полимерног млаза тежи да смањи површину по маси, док електростатичке силе покушавају да је повећају. Већи површински напон доводи до смањења полупречника млаза и као резултат млаз ствара перлице. (38) Због тога, смањење вискозитета раствора и густине наелектрисања доводи до формирања влакана са перлама. Додавање мале количине соли или полиелектролита у раствор повећава наелектрисање које носи млаз током процеса електроспиновања и на тај начин повећава истезање млаза. Као резултат, добијају се влакна без перли. (93)

1.4.1 Полимери. Класификација полимера

Наука о полимерима представља једну од најдуже проучаваних области у научним истраживањима. Први пут је дефинисана је као засебна грана од стране немачког хемичара Х. Штаудингера пре око 100 година између 1920. и 1930. године. (94) Полимер (гр. *poly-*, "много" + *-mer*, "део") је супстанца или материјал који се састоји од великих молекула или макромолекула састављених од многобројних понављајућих подјединица. (95) Полимери могу бити синтетички и природни. Због широког спектра својстава, и синтетички и природни полимери играју битну и свеприсутну улогу у свакодневном животу. (95)

Представници синтетичких полимера су познати синтетички производи попут полистирена, док природни представници су биополимери као што су дезоксирибонуклеинска киселина (ДНК) и протеини, који су основа за биолошку структуру и функцију живих организама. Полимери настају полимеризацијом мноштва малих молекула, познатих као мономер. Њихова релативно велика молекулска маса, у односу на једињења малих молекула, пружа јединствена физичка својства, укључујући њихову жилавост, високу еластичност, и склоност стварању аморфних и полукристалних структура. (96) Разноликост и број постојећих полимера се повећава уједно због огромних могућности које пружају синтетичке методе у органској хемији. Ово омогућава синтезу потпуно нових материјала са одређеним карактеристикама, или драстично побољшање својстава и особина полимера који већ постоје. (97)

Што се тиче употребе материјала у биомедицини, на основу литературних података може се закључити да аутори преферирају употребу три врсте полимера: 1) синтетичких полимера 2) полимера на бази полисахарида, и 3) полимера на бази

протеина. (98) Најчешћи синтетички полимери који се користе су најлон, поливинилалкохол (PVA), поли (L-лактидна киселина) (PLLA), поликапролактон (PCL), полиетиленгликол (PEG), и многи други. (99) Експериментална истраживања са синтетичким полимерима се често користе из разлога доступности, цене, прилично уједначене дистрибуције мономера у једињењу и њихове растворљивости. С друге стране, многи материјали који поседују оптимална физичко-хемијска својства неопходна за електроспиновање, се не користе због доказане токсичности у *in vitro/in vivo* условима. (100)

Природни полимери на бази полисахарида се користе у многим студијама и примењеној науци за производњу електроспинованих скефолда. У ове сврхе најчешће се користе алгинати, хитин, хитозан, хијалуронска киселина и други. Ова група природних полимера је посебно атрактивна због својстава биокомпатибилности, ниске цене и могућности лаке модификације за различите примене. (101) Алгинати су изузетно доступни у природи и користе се за процес електроспиновања у различите сврхе (102), (103) као и хитин, хитозан (104), (105) и хијалуронска киселина. (106) Трећа веома важна група природних полимера је на бази протеина, као што су желатин, (107) колаген (108) и соја, који се посебно користе за добијање скефолда који веома успешно имитирају ванћелијски матрикс. (96) Посебно је важна чињеница да природно добијени полимери не захтевају агресивне хемијске раствараче за њихово растварање.

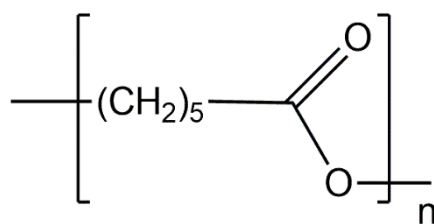
Синтетички полимери пружају високу флексибилност у синтези, преради и модификацији и исплативији су од природних. Међутим, синтетичким полимерима недостаје биоактивност и стога им је потребан већи ниво модификације него природним. С друге стране, природни полимери су инхерентно биоактивни, пружају бољу адхезију, пролиферацију и диференцијацију ћелија за разлику од синтетичких скефолда. (109) Посебно треба напоменути да су производи разградње природних полимера хемијски бенигни и изазивају релативно слаб имуни одговор. Да би се искористиле предности и синтетичких и природних полимера, потребна су константна истраживања за новим комбинованим полимерима како би се добили скефолди са задовољавајућим физичким својствима и високом биоактивношћу, уколико се говори о примени у ткивном инжењерингу. (110)

1.4.2 Синтетички полимери

Истраживање спроведено за потребе ове докторске дисертације укључује употребу синтетичких полимера: поликапролактон (PCL), полиетиленгликол (PEG) и полилактидна киселина (PLA). Ово поглавље даје опширнији опис ових полимера.

PCL спада у биоразградиве полиестре. По први пут је синтетисан 1930-их година, али није био широко коришћен због споре стопе деградације и немогућности да поднесе тешка оптерећења. Популарност је добио након појаве области ткивног инжењеринга 1990-их година. (111) То је алифатични полукристални полимер са температуром топљења у распону између 59°C и 64°C. (112) Стога, на физиолошкој температури, полукристални PCL има гумено стање што резултира његовом високом жилавошћу и супериорним механичким својствима (висока чврстоћа и еластичност у зависности од његове молекулске масе). Није токсичан и компатибилан је са живим ткивима, и широко се користи као скефолд у регенеративној медицини и испоруци лекова. (113)

Због присуства пет хидрофобних $-CH_2$ делова у својим понављајућим јединицама, PCL се најспорије разграђује од свих полиестара, па је често потребно комбиновати полимере са циљем повећања деградационе стопе. (114) Структурна формула полимера је приказана на **Слици 5**.



Слика 5. Структурна формула поликапролактона (PCL)

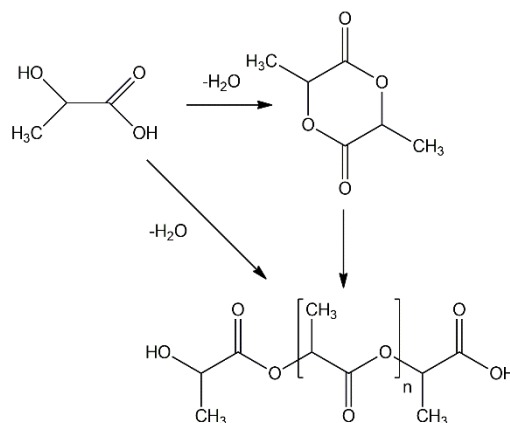
Електроспинована PCL влакна опонашају ванћелијски матрикс. (115) Просечан пречник добијених влакана се креће у распону 500–900 nm. (116) Природни полимери се могу додати смеси раствора PCL-а како би се побољшала његова механичка својства. (117) Студије потврђују његову биокompatibilност након краткорочног и дугорочног излагања без нежељених реакција од стране ткива домаћина. (118), (119) Такође PCL композити подржавају раст адипозних матичних ћелија добијених из ендотела људских коронарних артеријских ћелија. (119) Показало се да су композитни скефолди хитозан-PCL компатибилни са Швановим нервним ћелијама. (117)

Што се тиче разградње, потребно је приближно годину дана за скоро потпуну деградацију овог полимера, међутим потпуна деградација се очекује тек након четири године. У људском телу, деградација протиче у два корака. Током прве године долази до хидролизе естарских група, а затим долази до интрацелуларне деградације. (111) Деградација полимера, у суштини, зависи од молекулске масе полимера и нивоа кристализације. (120) Спора деградација оваквог синтетичког полимера је корисна у случајевима неуралних регенерација јер нерви захтевају дужи период регенерације. (117)

PLA је тренутно један од најзаступљенијих полимера на тржишту. Врло је термопластичан, веома биокompatibilан и може се лако апсорбовати кроз тело. (121)

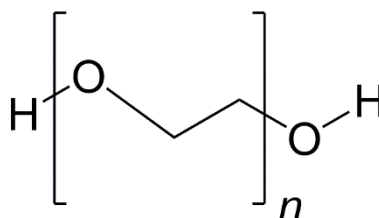
Када се производе полимери млечне киселине, они се могу синтетисати на начин који омогућава различите стопе разградње. Кинетика хидролизе одређеног полимера је комплексан концепт који одређује колико ће брзо импланти деградирати. Густина, јачина везе, присуство водоничне везе и хидрофилност играју велику улогу на стопу деградације полимера. Променом брзине деградације, може се добити полимер са жељеном стопом деградације. (122) Најбрже стопе деградације су повезане са имплантатима који деградирају изнутра, док спорији деградирају само на површини. Тзв. површинска деградација је корисна за брзо ослобађање одређених једињења из скефолда. (123)

У биомедицинској примени, PLA је идеалан полимер за краткотрајне фиксације, нпр. код санације прелома. Ова врста фиксације је обећавајућа за адолесценте који још увек расту. (124) Конвенционални биостабилни уређаји не би били идеални за овакав тип полимера због неисправног функционисања скефолда у динамичном окружењу. Хемијска структура PLA је приказана на **Слици 6**.



Слика 6. Добијање полилактидне киселине (PLA)

PEG је линеарни или разгранати полиетар са општом структуром која садржи терминалне хидроксилне групе (Слика 7). (125)



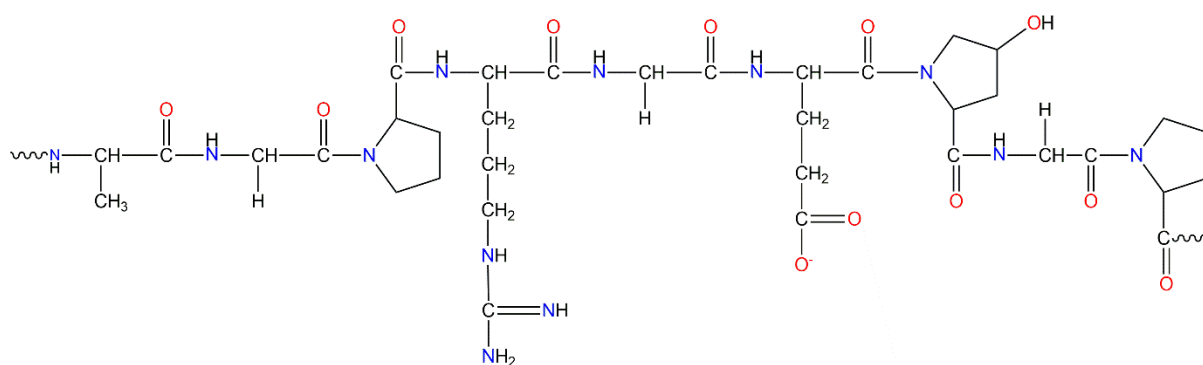
Слика 7. Структурна формула полиетиленгликола (PEG)

Неке релевантне карактеристике за његову употребу у биомедицини укључују растворљивост у води и органским растварачима, контролисану растворљивост, нетоксичност и широку потражњу у ткивном инжењерингу. (126) PEG се увелико користи у биомедицини јер не поседује токсичне, неимуногене и неантигене особине, па стога не изазива инфламаторне одговоре када се унесе у тело. (127) Подесива биоразградивост овог синтетичког полимера је једна од најважнијих карактеристика у биомедицинској примени. Међутим, PEG није реактиван и захтева функционализацију путем процеса крослинковања са другим полимерима, односно функционалним групама како би дошло до стварања нераскидивих веза. (128) Добијени умрежени скефолди се најчешће користе за добијање хидрогелова или композита за биомедицинске примене, за зарастање рана, испоруку лекова и као базе за регулисање биолошке адхезије. (129), (130)

Комбиновање различитих компатибилних полимера је једна од најчешће коришћених метода при развоју вештачких имплантата. (131) Врло је тешко добити потенцијално успешан биокompatибилан материјал од само једног полимера, без икаквих додатних модификација. PEG се увелико користи у биомедицинске сврхе због своје биокompatибилности, нетоксичности и растворљивости у води. Стога, додаток одговарајућег полимера само унапређује његове карактеристике и претвара га у реактиван облик полимера. Дакле, као пример можемо навести синтетисани скефолд у овом истраживању - PCL/PEG, где додатком PEG-а добијени скефолди су били глаткији, механички резистентнији, а хидрофилнији и разградљивији због присуства PEG компоненте. (119)

1.4.3 Природни полимери

Желатин је неимуногени протеин, добијен из парцијалне хидролизе колагена, главног структурног протеина дермалног екстрацелуларног матрикса. (132) Због своје полиелектролитне природе и великог броја јаких водоничних веза, желатин се тешко електроспинује без додавања других полимера, како би се побољшала стабилност добијених влакана. Структурна формула желатина је приказана на **Слици 8**. (133), (134)



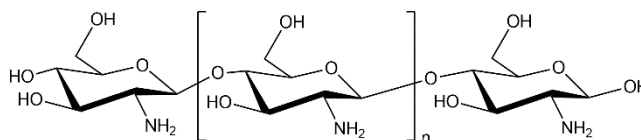
Слика 8. Хемијска структура желатина

Желатин се састоји од смеше воде и пептидних фрагмената. Присутни пептидни фрагменти су због животињског порекла самог желатина. (135) Желатин је дериват колагена, чија се густина и степен умрежавања могу контролисати, чиме се омогућава прилагођавање механичких својстава и хемијске реактивности материјала. Модификације могу послужити у циљу добијања што ефикаснијег материјала за одабрану функцију и примену. (134) Поред ниске цене на тржишту, желатин поседује супериорне карактеристике биокомпатибилности и лако се добија. Желатин се користи у фармацеутској индустрији као медијум за испоруку лекова, најчешће у облику оралне капсуле. У савременој регенеративној медицини све већи фокус је усмерен на методе које омогућавају контролисану и локализовану испоруку активних агенаса. Скефолди синтетисани на бази желатина су показали велики потенцијал као ефикасни системи за циљану испоруку лекова. (136) Према литературним подацима, матрице желатина обogaћене пептидом повезаним са геном за калцитонин (CGRP), подстакле су регенерацију кости у моделу остеопоротичног дефекта код зеца. Утврђено је да је брзина формирања нове кости била у позитивној корелацији са примењеном дозом активних молекула. (137)

Влакна желатина, односно скефолди на бази желатина, показују изузетан потенцијал у регенерацији различитих врста ткива и органа, укључујући кожу, кости, мишићи и нерве. (132) Иако се желатин најчешће користи као систем за испоруку лекова, његова примена у биомедицинском инжењерингу није ограничена само на ту област. Према подацима једне студије, синтетисани двокомпонентни полимерни систем, који представља смешу желатина и 2-хидроксиетил метакрилат (HEMA) мономера је био успешно примењен у регенеративној медицини. (138) Тако добијени материјал је механички тестиран да би се утврдило, да ли поседује својства слична кожном ткиву. Након тога, *in vivo* патохистолошке анализе спроведене на моделу опекотина животиња показале су убрзано зарастање рана услед третмана овим материјалом.

Друга важна група природних полимера у биомедицини обухвата полисахариде, односно угљене хидрате, као што су хитин и његов дериват хитозан. Ови биополимери се користе као скефолди због својих изузетних особина, међу којима су биоразградивост, хидрофилност, неантигеност, нетоксичност, антимикробна активност, биоадхеренција и афинитет према здравим ћелијама. (139) Хитозан је N-деацетиловани дериват хитина и веома је структурно сличан гликозаминогликанима (GAG) који су природно присутни у екстрацелуларном матриксу. Главни је дериват полисахаридног полимера хитина, који се налази у скелету и унутрашњој структури бескичмењака, као што је егзоскелет шкољки. По распрострањености у природи, хитин је други најзаступљенији природни полисахарид после целулозе. Структурна разлика између хитина и хитозана је у замени ацетамидне групе хидроксилном на позицији C-2, што хитозану даје специфична биолошка и функционална својства.

У овом истраживању, хитозан је коришћен као представник групе полисахарида. Најчешћу примену налази у домену зарастања рана, при чему поседује антимикробно и имуностимулирајуће дејство. (140), (104) Поред својих нетоксичних својстава, хитозан је природно богат биоматеријал са важним својствима за регенеративну медицину, као што је његова биокompatibilност и биоразградња. (141) Има добре биолошке перформансе и разграђује се у производе који се лако апсорбују у организму. Са друге стране, један од главних недостатака хитозана су слаба механичка својства, због чега се најчешће користи као компонента композитних материјала. (142) Чист хитозан је изузетно захтеван за електроспиновање, па се у ту сврху комбинује са другим полимерима који омогућавају формирање влакана, као што су као полиетилен оксид (PEO), полилактидна киселина (PLA), поливинил алкохол (PVA), и колаген. (143) Структура хитозана је приказана на **Слици 9**.



Слика 9. Хемијска структура хитозана

Више студија је показало да је процес разградње хитозана уско повезан са његовим степеном ацетилације и молекулском масом. *In vivo* испитивања указују на то да се хитозан може разградити на различите начине. Код оралне примене, деградација се дешава углавном у гастроинтестиналном тракту, док се код интравенске примене може разградити у јетри и бубрезима. (144)

У зависности од специфичне примене, својства материјала базираних на хитозану могу се побољшати комбиновањем са другим биоматеријалима или хемијским агенсима. На пример, за примене у коштаном систему, микропорозни композитни скефолди који садрже хитозан/калцијум фосфат показали су побољшано везивање остеобласта који повећавају чврстоћу скефолда уз одржавање биокompatibilности. (104) Такође, композит хитозан-гликозаминогликан успешно се користи за регенерацију и обнављање зглобне хрскавице. (145)

Што се тиче зарастања рана, деацетилација хитина у хитозану показала је значајно побољшање у његовој интеракцији са ткивима сисара. Ћелије које учествују у овом процесу су остеобласти, фибробласти, макрофаге и кератиноцити, који активно доприносе процесу регенерације. (146) Хитозан поседује позитиван ефекат како на

реепителизацију, тако и на регенерацију грануларног слоја коже. У примени за регенерацију ткива, хитозан се користи на два начина. Први је када се користи за формирање нове коже, с обзиром на то да поседује карактеристике сличне глюкозаминогликанима, који су основна компонента коже. (147) Други начин примене је у процесу зарастања рана и фиброплазије, где стимулише формирање фиброзног ткива у ранама. (148) Бројне студије потврђују изузетан потенцијал хитозана у примени за ткивни инжењеринг. (149), (150), (147)

1.4.4 Растварачи у производњи нановлакна

Одабир растварача представља један од кључних фактора за формирање глатких електроспинованих влакана без дефеката. (33) При избору одговарајућег растварача, неопходно је узети у обзир два кључна фактора. Први фактор је да растварач мора бити компатибилан са полимером како би се добила потпуно хомогена смеша. Други фактор је да растварач треба да има одговарајућу тачку кључања, која ће омогућити испарљивост. Растварачи који брзо испаравају сматрају се пожељним јер омогућавају брзо испаравање органског растварача и таложења биополимера, односно формирање влакана на колектору. Међутим, веома испарљиви растварачи се углавном избегавају јер их карактеришу ниске тачке кључања и високе стопе испаравања, што може довести до сушења млаза на врху игле, блокирајући њен отвор, а самим тим онемогућавајући процес електроспининга. Такође, растварачи са високим тачкама кључања нису погодни јер не испаравају довољно брзо током формирања влакана. (151), (152)

Бројне истраживачке групе проучавале су ефекте растварача и система растварача на морфологију влакана (153) и утврдиле да поред примењеног напона, растварач поседује велики утицај на полимерни систем. (38) Поред испарљивости, важни фактори су и проводљивост растварача, као и његов диполни момент. (29)

Вода је најчешће коришћени растварач због своје безбедности и биокompatбилности са ткивима. Међутим, његова употреба је ограничена на хидрофилне полимере. Поред овог ограничења, растворљивост полимера у води је често велике вискозности и резултира малом количином електроспиновоаног материјала јер долази до дисперзије молекула у раствору. (133)

Што се тиче органских растварача који се најчешће користе у процесу електроспиновања, њихов списак је приказан у **Табели 2**. Главни недостаци органских растварача су њихова токсичност и цена. Да би се постигао оптималан вискозитет раствора, површински напон и испарљивост растварача, често се комбинују два или више различитих растварача. Природни полимери обично испољавају одређене потешкоће у припреми за електроспиновање, углавном због проблема са растворљивошћу, па се синтетички полимери обично мешају са малим количинама природних полимера како би се побољшала њихова растворљивост. (154), (155)

Табела 2. Најчешће коришћени растварачи у процесу електроспининга.

Растварач	Хемијска формула	Тачка кључања (°C)	Диелектрична константа	Површински напон (mNm ⁻¹)	Токсичност
Вода	H ₂ O	100	80.1	73.05	-
Хлороформ	CHCl ₃	61	4.8	27.14	Канцероген
Диметилформамид	C ₃ H ₇ NO	153	38	37.1	Запаљив, тератоген

Дихлорметан	CH ₂ CL ₂	40	8.9	26.52	Запаљив, тератоген, канцероген
Сирћетна киселина	CH ₃ COOH	118	6.2	27.8	Корозивно
Хексафлуороизопр опанол	HFIP	58.2	16.7	16.14	Корозивно, токсично
Етанол	C ₂ H ₆ O	79	30	22.75	Запаљив
Изопропанол	CH ₂ OH	82	18	21.7	Запаљив, токсичан

1.5 Анализа и карактеризација полимерних нановлакана

Након формирања жељених влакана, спроводи се морфолошка карактеризација узорака применом различитих микроскопских техника. Најчешће коришћене методе укључују: оптичку микроскопију (ОМ), скенирајућу електронску микроскопију (SEM), трансмисиону електронску микроскопију (ТЕМ) и микроскопију атомских сила (AFM). (156), (157) Ове технике омогућавају детаљно испитивање морфологије влакана, укључујући одређивање њиховог пречника, величине пора и укупне порозности скефолда.

За карактеризацију хемијске и молекулске структуре влакана, најчешће се користи инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR). У наставку су описане све наведене технике карактеризације.

1. Оптички микроскоп (ОМ)

Оптички микроскоп, познат као и светлосни микроскоп, користи видљиву светлост и систем сочива како би омогућило увећано посматрање испитиваних узорака. Резолуција оптичког микроскопа се дефинише према следећој релацији:

$$R = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (7)$$

где је R резолуција слике, λ је таласна дужина светлости, n је индекс преламања, α је угао преламања и NA је нумеричка апертура објектива. (158) Резолуција која се може постићи помоћу оптичког микроскопа износи приближно 200 nm.

На **Слици 10** приказан је стандардни оптички микроскоп. Ова техника омогућава основну, али поуздану морфолошку анализу влакана. Геометријске карактеристике као што су пречник влакана, расподела пречника, оријентација и морфологија влакана могу се окарактерисати са прилично високим степеном тачности коришћењем оптичког микроскопа.

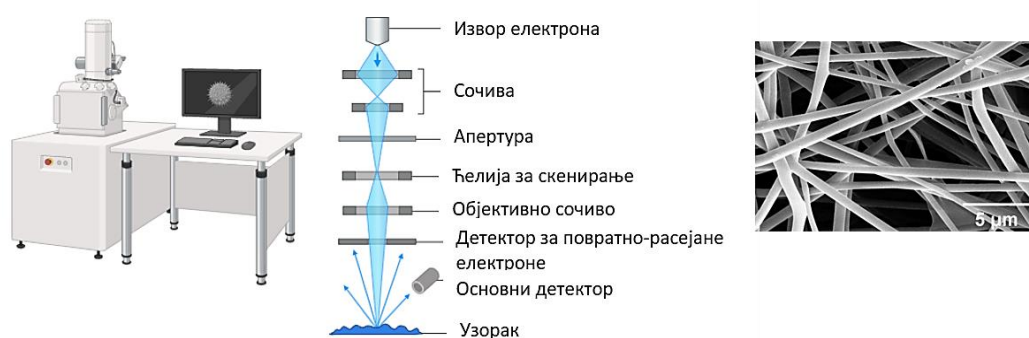


Слика 10. Оптички микроскоп

2. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM)

Скенирајућа електронска микроскопија (енгл. *SEM – Scanning electron microscopy*) представља једну од најчешће примењених техника за морфолошку карактеризацију влакана, посебно у погледу њихове структуре, оријентације и површинских карактеристика. (159) Метода SEM омогућава добијање слика високе резолуције које пружају детаљне информације о храпавости, порозности и другим површинским својствима скефолда. (160), (161)

Да би се омогућило снимање узорака SEM технологијом, они морају бити електрично проводљиви. У случају непроводљивих узорака, најчешћа процедура подразумева распршивање танког проводног слоја (нпр. злата или титанијума) на површину узорка. Након припреме, електронски пиштољ генерише сноп електрона, који се помоћу електромагнетних сочива фокусира на изабрану површину. Током скенирања, долази до интеракције примарног снопа са узорком, што резултира емисијом секундарних електрона. Ови секундарни електрони се детектују, електронски појачавају и трансформишу у дводимензионалну слику, која визуализује морфологију узорка. Шематски приказ SEM технике је дан на **Слици 11**. (162)



Слика 11. Шематски приказ SEM инструмента. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

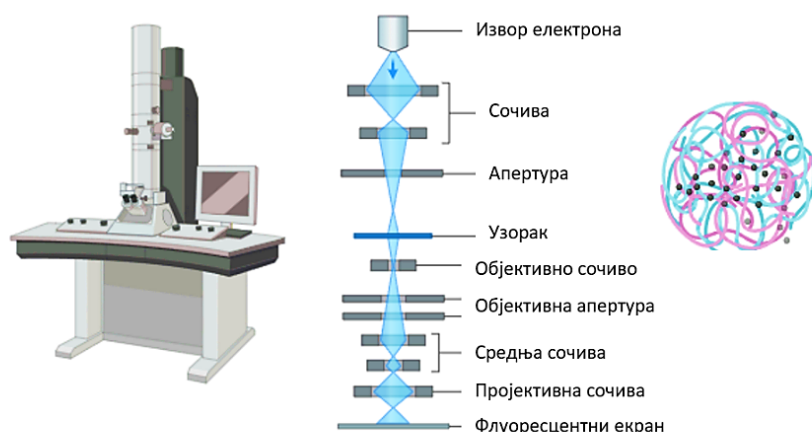
SEM је најчешће коришћена метода за карактеризацију због своје доступности и једноставности примене. Ова метода омогућава прецизно одређивање димензије пора, укључујући њихову ширину и дужину, што је од великог значаја за разумевање микроструктуре добијених влакана. (163) За добијање поузданих и репрезентативних резултата, неопходно је анализирати довољан број узорака, како би се извела статистичка процена морфолошких параметара. У поређењу са оптичком микроскопијом, SEM омогућава знатно детаљније испитивање захваљујући већој резолуцији, већој дубини поља и већој осетљивости на топографију површине узорка. (164)

3. Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ)

Трансмисиона електронска микроскопија (енгл. *ТЕМ – Transmission electron microscopy*) представља напредну технику за анализу морфологије и унутрашње структуре влакана, у којима се сноп електрона пропушта кроз ултратанак узорак. Формирана слика се затим приказује на флуоресцентном екрану или се региструје помоћу наелектрисано-спрегнутог уређаја. Теоретска резолуција ТЕМ-а достиже 0.02 nm, али због сферне аберације, у пракси је ограничена на приближно 0.2 nm. (165)

У трансмисионој микроскопији, интеракција електронског снопа са узорком се углавном одвија путем дифракције, а не апсорпције. Интензитет пренетих електрона зависи од дебљине и густине материјала, као и од кристалне оријентације атомских равни у односу на долазећи сноп. (166) Под одређеним угловима сноп електрона се снажно дифрактује од осе долазног снопа зрака, док под другим угловима сноп пролази без значајних промена.

Микрографије високе резолуције се добијају блокирањем одбијених електрона од оптичке осе микроскопа уз подешавање отвора бленде, при чему се омогућава пролазак само нерасејаних електрона. На тај начин, промене у интензитету пренетих електрона пружају детаљне информације о кристалној структури узорка, које се затим визуализују на детектору. (167) Шематски приказ технике је дат на **Слици 12**.



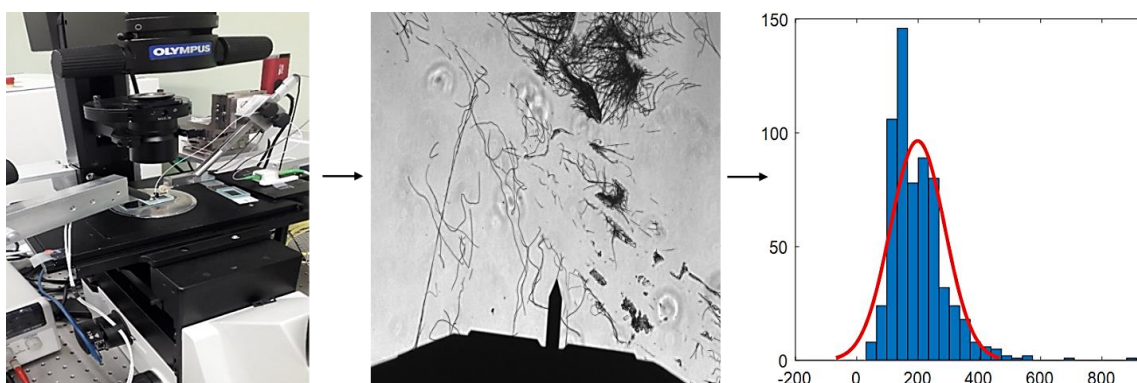
Слика 12. Шематски приказ ТЕМ инструмента. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Као и SEM, TEM се користи за детаљну карактеризацију геометријских својстава влакна, укључујући пречник, расподелу величине, оријентацију и морфологију влакана (нпр. облик попречног пресека и храпавост површине). За разлику од SEM-а, TEM анализа не захтева да узорак буде потпуно сув, што представља значајну предност. Добијена електроспинована влакна се могу одмах анализирати директно након припреме, без додатних корака сушења или метализације. (78)

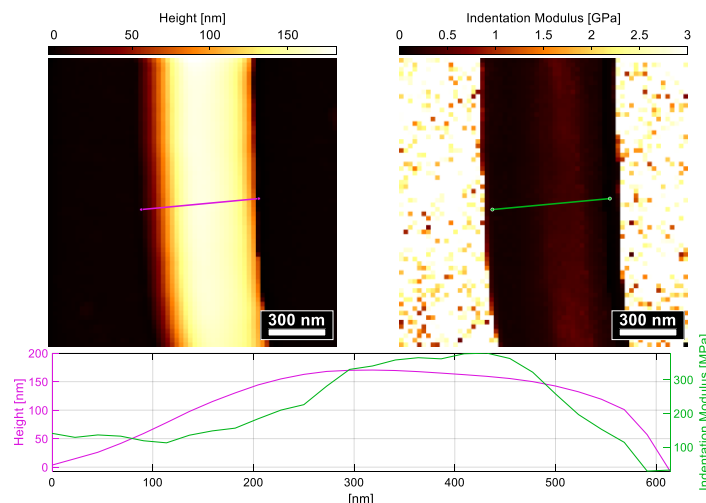
4. Микроскопија атомских сила (AFM)

Радни принцип микроскопије атомских сила (енгл. *AFM – Atomic force microscopy*) су први дефинисали Binnig, Quate and Gerber, чиме су поставили темељ нанотехнологије као научне дисциплине. (168) AFM се заснива на употреби врло осетљиве сонде, која скенира површину узорка са атомском резолуцијом. Ова техника омогућава добијање детаљних информација о топографији, морфологији, храпавости површине, као и оријентацији влакана и расподели честица на површини узорка. (169), (170)

Инструмент се састоји од конзоле са шиљастим врхом (сондом), најчешће направљеном од силикона или силицијум нитрида. Када се врх довољно приближи површини узорка, долази до деформације конзоле услед сила интеракције, које укључују Ван дер Валсове, електростатичке, капиларне, магнетне и хемијске силе. (171), (168) Ове интеракције се региструју кроз промену положаја ласерског зрака, који се одбија од позадине конзоле и детектује на фотодиодном детектору. На тај начин, добијају се микрографије високе резолуције, које одражавају промене у топографији површине у нанометраском опсегу. (172) На **Слици 13** приказан је шематски принцип рада AFM-а, док **Слика 14** приказује добијене резултате модула индентације PCL:PEG влакана испитиваних у оквиру овог истраживања.



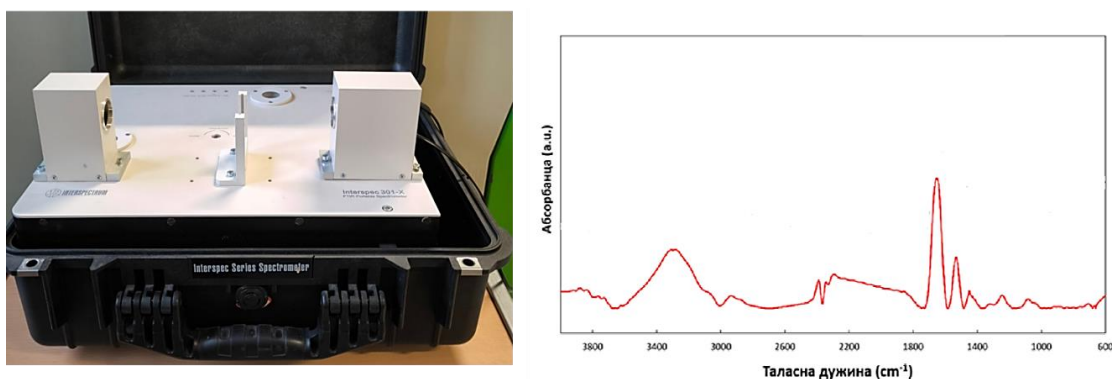
Слика 13. Процес рада AFM инструмента



Слика 14. Резултат модула индентације за испитивана PCL:PEG влакна

5. Инфрацрвена спектроскопија Фуријеове трансформације (FTIR)

Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (енгл. *FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy*) представља напредну аналитичку технику која омогућава добијање спектра апсорпције мерењем временске кохерентности зрачења у временском домену. Основа FTIR спектрометра је Мајклсонов интерферометар са покретним огледалом, који генерише интерференцијски образац уз промену положаја огледала. Тај образац садржи све фреквенције зрачења, које емитује извор и накнадно се применом Фуријеове трансформације конвертује у инфрацрвени спектар. (173) Инструмент за FTIR спектроскопију, као пример спектра добијеног анализом одређене супстанце, приказани су на Слици 15.



Слика 15. FTIR инструмент и пример добијеног спектра

Интерферометар се састоји од два огледала постављена под правим углом и разделника снопа под углом од 45° у односу на њих. Упадни инфрацрвени зрак се дели на два дела – сваки се рефлектује од појединачног огледала, а затим се снопови поново спајају. Континуирано померање једног огледала дуж осе доводи до фазног померања зрачења и стварања интерференцијског обрасца, који представља суперпозицију свих инфрацрвених таласних дужина.

Инфрацрвено зрачење носи довољно енергије да индукује вибрациона и ротациона кретања молекула. До апсорпције зрачења долази само уколико вибрације доводе до промене диполног момента молекула, као што је случај, на пример, код $-\text{CH}_2$ група. (174) Апсорпција је повезана са прелазом молекула из једног енергетског нивоа у други, што се описује следећом једначином:

$$\Delta E = h\nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (8)$$

где ν је вибрациони квантни број, k је константа силе, и μ је редукована маса осцилатора. Енергија фотона је пропорционална фреквенцији, апсорпционе фреквенције се често изражавају у као таласни бројеви у cm^{-1} , при чему важи:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (9)$$

Припрема узорак се најчешће врши мешањем са KBr који служи за мерење апсорпције инфрацрвеног зрачења. Густе узорци могу изазвати расипање зрачења, што смањује интензитет преношеног зрачења. (175) Непосредно пре припреме и покретања снимања и анализирања, потребно је уклонити присуство воде из узорка, јер вода снажно апсорбује у инфрацрвеном домену, при чему се могу добити погрешни резултати. Калибрација апарата је такође битан фактор који може утицати на добијене резултате.

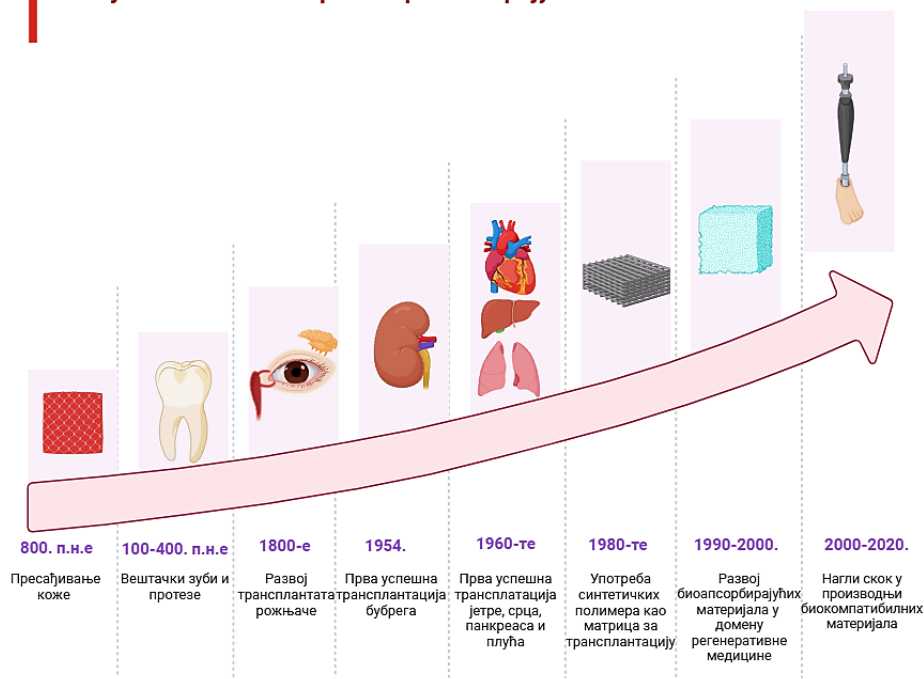
FTIR спектроскопија се често користи за праћење промена у молекулској структури, укључујући конформационе промене у полимерима, које се јављају током процеса електроспининга.

1.6 Ткивни инжењеринг

Реконструкција и регенерација људских органа и ткива представља озбиљан изазов за хирурге и ткивне инжењере данашњице. Због тога, биоапликативна медицина постаје све значајнија област савремене науке, а ткивни инжењеринг, као грана савремене медицине, има задатак да развија нове методе и технике које ће олакшати и унапредити савремене приступе лечења. (176)

Ткивни инжењеринг представља релативно нову, али веома динамичну област науке која обједињује знања из клиничких дисциплина са циљем решавања озбиљних медицинских проблема, као што су губитак ткива и отказивања органа. Разумевање односа структуре и функције у нормалним и патолошким ткивима и праћење развоја биолошких замена за обнављање, одржавање или побољшање функција представља најосновнији принцип и задатак ткивног инжењеринга. (177) Раније се ова област науке звала реконструктивна хирургија, а касније је преименована у ткивни инжењеринг, кад је пажња била усмерена на израду живих имплантата за органе и оштећене делове тела. (178) **Слика 16** приказује свеобухватан приказ развоја ткивног инжењеринг као посебне гране савремене медицине.

Развој ткивног инжењеринга кроз историју



Слика 16. Развој ткивног инжењеринга кроз историју. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Дефиницију појма нанотехнологије као засебне гране науке је увео Дрекслер 1986 године, (179) а касније је ова грана науке постала све интересантнија због широког спектра примене у разним сферама, како у индустрији, тако и у биомедицини. С обзиром на то да је главна компонента ове гране вештачки материјали, велики број истраживања се бави њиховим добијањем, карактеристикама и потенцијалима. Посебну пажњу изазивају наноматеријали, који су се током протеклих година истакли као веома обећавајући кандидати у различитим областима - од ткивног инжењеринга и система за контролисану испоруку лекова, до производње заштитне одеће, наносензора и многих других савремених технолошких решења. (180)

Када је реч о примени у биомедицини, вештачки материјали морају испољавати низ одређених услова, да би могли бити разматрани као потенцијални супстрати за замену или регенерацију ткива и органа. (181), (182), (183) Један од кључних услова је обезбеђивање адекватног окружења за опстанак, пролиферацију и диференцијацију за *in vitro* истраживање, што је од суштинског значаја за ефикасно моделирање и регенерацију ткива.

Конструисање вештачких материјала представља сложен задатак. Велики број фактора је потребно узети у обзир, јер дизајнирани имплантати не смеју бити токсични, самим тиме не смеју изазивати упалу, која може испровоцирати неадекватан имуни одговор и одбацивање материјала. Само материјали који омогућавају стабилност и подршку ћелијама у физиолошким условима могу бити озбиљни кандидати за примену у савременој регенеративној медицини. (181)

У савременој биоинжењерској и биомедицинској индустрији, интересовање за вештачке материјале, који омогућавају ефикасно зарастање и регенерацију оштећених ткива и органа је у сталном порасту. Бројне компаније широм света интензивно улажу у развој технолошки напредних решења. Један од примера је компанија *Life Cell*, позната по развоју трансплантата за ткива и чување крвних продуката намењених за трансфузију. У сарадњи са компанијом *Medtronic*, светски признатим лидером у области

кардиохируршких уређаја, развијени су и моделирани свињски срчани залиски, који се користе као биолошки имплантати у трансплантацијама. (184)

Војна медицина представља једно од најактивнијих поља примене производа ткивног инжењеринга. На пример, клиничко испитивање вештачког људског дермалног ткива комбиновано са синтетичким епидермалним слојем за лечење хемијских опекотина, финансирано је од стране Института Америчке војске. Овај трансплантат углавном штити кожу од опекотина и минимизира развој микробне инфекције, иако се пацијенти суочавају са великим проблемима, укључујући ограничену понуду вештачких трансплантата, акутно имунолошки одговор и потенцијални развој патогена. (185)

Биоматеријали играју кључну улогу у инжењерингу ткива, пре свега као тродимензионале (3D) структурне потпоре, које треба да обезбеде ћелијску адхезију, пролиферацију и диференцијацију, уз формирање нових ткива или органа. (184) Током дизајнирања материјала, потребно је узети у обзир да следећи услови буду задовољени:

1. Одговарајућа порозност материјала погодна за миграцију ћелија
2. Одговарајући облик површине материјала
3. Одговарајуће хемијске, физичке и биолошке карактеристике погодне за ћелијску адхезију, раст, миграцију и диференцирање
4. Задовољавајућа стопа деградације, која треба да се поклапа са брзином регенерације ткива

Из тог разлога, до сада су истражене бројне методе за добијање скефолда, који симулирају окружење природног ткива. (186) У већини случајева, материјали који се користе у ткивном инжењерингу се добијају управо путем процеса електроспининга. (187) Ова савремена техника је привукла велику пажњу научне и стручне јавности због једноставности и лакоће извођења поступка, као и због супериорних особина нановлакна. Главни циљ примене електроспининга у ткивном инжењерингу јесте производња структура, које oponашају структуру екстрацелуларног матрикса.

Да би се омогућила функционална регенерација, скефолди морају обезбедити циркулацију кисеоника и хранљивих материја, као и да уклоне метаболички отпад у периоду регенерације ткива. (151), (188) Електроспиновани скефолди поседују релативно висок однос површине и запремине, подесиву порозност и савитљивост, и самим тим се могу прилагодити широком спектру величина и облика. Због тога, ови материјали налазе широку примену у модерној биомедицини (Слика 17). (189)

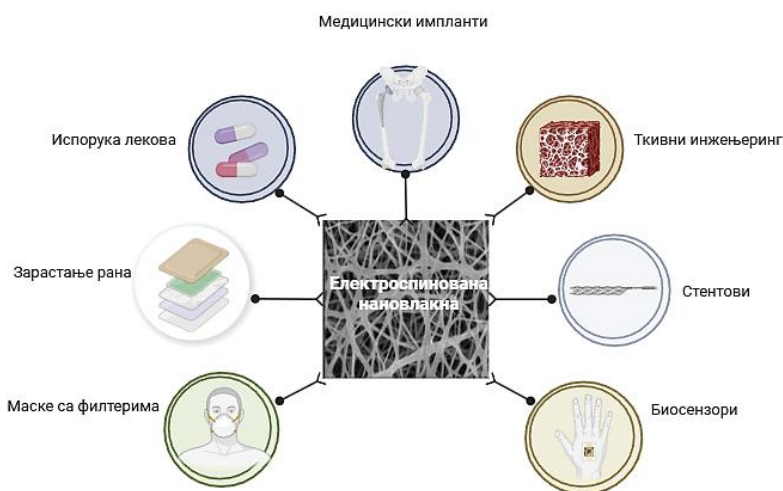
Досадашња истраживања у области ткивног инжењеринга углавном су се фокусирали на прелиминарне (*in vitro*) анализе, са циљем да се утврди начин на који реагују на присуство различитих биоматеријала. Ове анализе се односе на испитивање ћелијских процеса и промене у ћелијској морфологији након третмана са скефолдом.

Међутим, све већа пажња струке се придаје квантитативној процени вештачких материјала у циљу проучавања топографских особина и њиховог утицаја на ћелијске функције. Променом параметара процеса, могуће је контролисати оријентацију влакана и порозност скефолда – што је основни предуслов за прилагођавање биоматеријала појединачним случајевима примене. При томе, добијена влакна треба да поседују карактеристике сличне карактеристикама природних ткива.

Један од значајних техничких помака се заснива на успешном дизајну и синтези нових полимерних материјала, који омогућавају контролу над структуром и својствима влакана. Ова својства обухватају хидрофилност, механичку стабилност, електричну проводљивост и структурну прилагодљивост.

На основу тога, све више студија истражује употребу скефолда од влакана у дизајнирању специфичних ткива, као што су коштано, нервно, васкуларно и хрскавично

ткиво, што потврђује велики потенцијал ових материјала у савременој биомедицинској пракси. (110), (190), (191)



Слика 17. Примена влакана у ткивном инжењерингу. Слика је креирана помоћу Biorender.com

1.6.1 Кожа. Хистолошка грађа коже

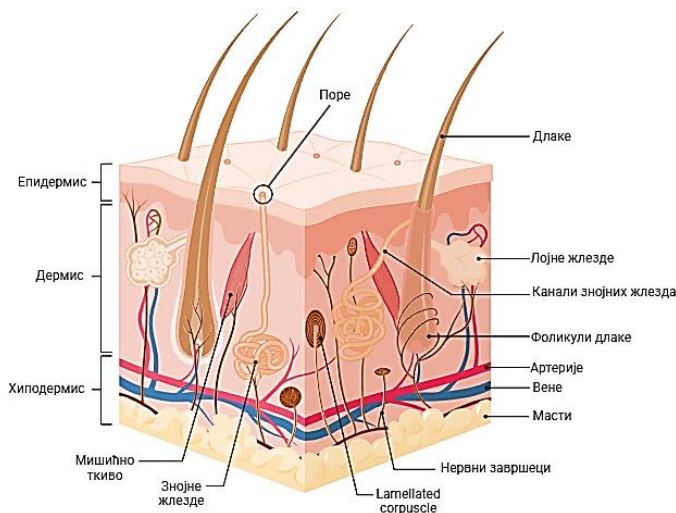
Кожа је највећи орган нашег тела и покрива целокупну спољашњу површину организма. Овај највећи орган у нашем организму (површине од 1.2 до 2.3 m²) врши низ функција од виталног значаја: представља баријеру, која спречава продор микроорганизама из околине, штити тело од дејства штетних агенаса из спољашње средине, спречава одавање воде из организма. Поред тога учествује у синтези витамина Д, регулацији телесне температуре, у бројним имунолошким, метаболичким, секреторним и респираторним процесима. Захваљујући богатој инервацији, служи и као важан сензорски орган, непрестано прикупљајући информације о средини, која нас окружује. (192)

Кожа се састоји из три слоја специфичне хистолошке грађе, функције и различитог ембрионалног порекла: површног слоја – епидермиса, који је ектодермалног порекла, дубљег слоја – дермиса, који је мезодермалног порекла и најдубљег слоја – хиподермиса, такође мезодермалног порекла. (Слика 18). (193)

Спољашњи слој је епидермис, плочасто-слојевити епител са процесом орожавања. Он налаже на базалну мембрану састављену од танког гликопротеинског слоја екстрацелуларног матрикса, који га одваја од дермиса. (194)

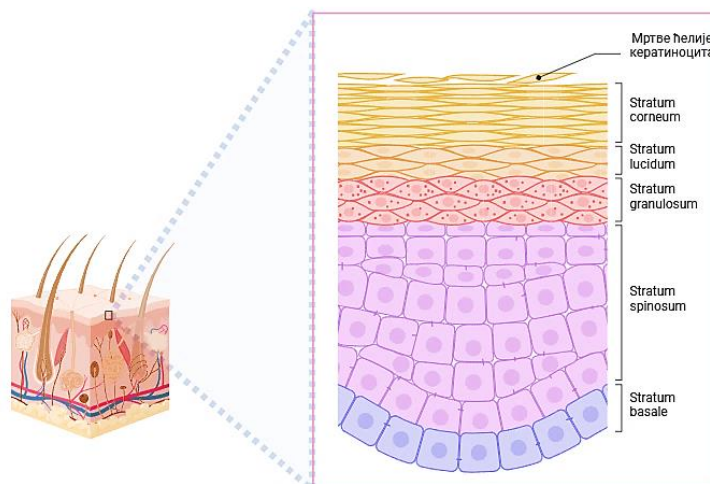
Дермис је богат везивним ткивом и садржи бројне додатке коже, као што су длаке, знојне жлезде, лојне жлезде, крвни и лимфни судови.

Најдубљи слој коже је хиподермис, представља топлотни изолатор и депо енергетског материјала, повезује кожу са мишићима и костима, омогућавајући њену покретљивост.



Слика 18. Структура коже. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Главну ћелијску популацију епидермиса чине кератиноцити, распоређени у неколико слојева почев од базалне мембране: лат. *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* (постоји само у кожи дланова и табана) и *stratum corneum* (Слика 19). (195) Ови слојеви представљају стадијуме диференцијације и кератинизације кератиноцита. Управо кроз овај процес, кератиноцити сазревају и постепено се крећу ка површини коже, где формирају заштитни слој мртвих ћелија – роговински слој (*stratum corneum*). Осим кератиноцита, у епидермису се налазе и меланоцити, Меркелове ћелије и Лангерхансове ћелије, које учествују у сензорној и имунолошкој заштити коже. (196)



Слика 19. Приказ епидермалне структуре и њених слојева. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Stratum basale (germinativum) представља најдубљи, матични слој епидермиса састављен од једног слоја цилиндричних ћелија. Интензивним деобама ћелија базалног слоја стварају се нови кератоцити, који мигрирају у више слојеве, да би се на крају диференцирали у орожалне ћелије, чиме се обнавља цео епидермис. Већ у овом слоју почиње синтеза кератинских филамената, која се наставља и у следећим слојевима. (197)

Stratum spinosum се надовезује на базални слој и састављен је од више слојева многоугаоних ћелија, које су све пљоснатије према површини епитела. У ћелијама које се налазе у горњим деловима овог слоја почињу да се диференцирају ламеларне грануле или кератинозоми чији се садржај егзоцитозом ослобађа изнад гранулозног слоја. (198)

Stratum granulosum чине два до пет слојева спљоштених, полигоналних кератиноцита са кондензованим једром. Унутар цитоплазме ових ћелија налазе се кератохијалинске грануле. (199) Ове грануле имају улогу у згушњавању кератинских филамената и формирању густе мреже на унутрашњој страни ћелијске мембране, чиме се ствара баријера за унос нутритивних супстанци у ћелију. Након тога кератиноцити орожавају, изумиру и премештају се у површнији слој епидермиса. Упоредо са тим, садржај ламеларних гранула се празни на површину гранулозног слоја формирајући епидермисну баријеру, која спречава губитак воде и пролаз супстанци, и на тај начин доприноси њиховој кератинизацији и десквамацији. (195)

Stratum lucidum слој је присутан само у пределу дланова и табана, где је кожа дебља. Ћелије овог слоја су изразито спљоштене, хомогеног изгледа, не поседују ни једро ни органеле, а у цитоплазми се налазе густо збијени кератински филаменти који штите овај део епидермиса.

Stratum corneum представља највиши слој епидермиса и састоји се од више слојева пљоснатих, орожалих ћелија без једра са задебљалом плазмалемом. Ћелије овог слоја се називају корнеоцити и представљају завршну фазу процеса кератинизације ћелија епидермиса. У корнеоцитима су присутни само кератински филаменти, и ове ћелије постепено десквамишу односно, „перутају се”, док се сталним деобама и диференцијацијама ћелија базалног слоја обнавља епител. (200)

Слој дермиса се налази испод базалне мембране епидермиса и састоји се од густог везивног ткива, које садржи колагена, еластична, ретикуларна влакна у основној супстанци, која заједно формирају чврсту, али еластичну мрежу заслужну за отпорност и флексибилност коже. Ћелијску популацију дермиса чине фибробласти, макрофаги, мастоцити и друге лутајуће ћелије везивног ткива. Главна функција дермиса је да пружи структурну подршку и заштиту, као и да учествује у терморегулацији и исхрани епидермиса. (201) Структурно, дермис се састоји из два подслоја: (202)

1. Папиларни слој – површински, тањи део дермиса
2. Ретикуларни слој – дубљи, масивнији део дермиса

Папиларни слој дермиса је састављен од растреситог везивног ткива. Садржи више ћелија и мање влакана од ретикуларног слоја. Присутна су танка еластична и колагена влакна. (200) Ћелијску популацију чине фибробласти, макрофаги и друге имуноаktivне ћелије.

Ретикуларни слој је грађен од гушћег везивног ткива са дебелим колагеним влакнима, која су распоређена у вишем степену структурне организације у поређењу са влакнима папиларног слоја. (203) Правилна оријентација дебелих колагених влакана доприноси отпорности коже на истезање. Између влакана су смештене лојне и знојне жлезде, фоликули длаке, као и крвни и лимфни судови.

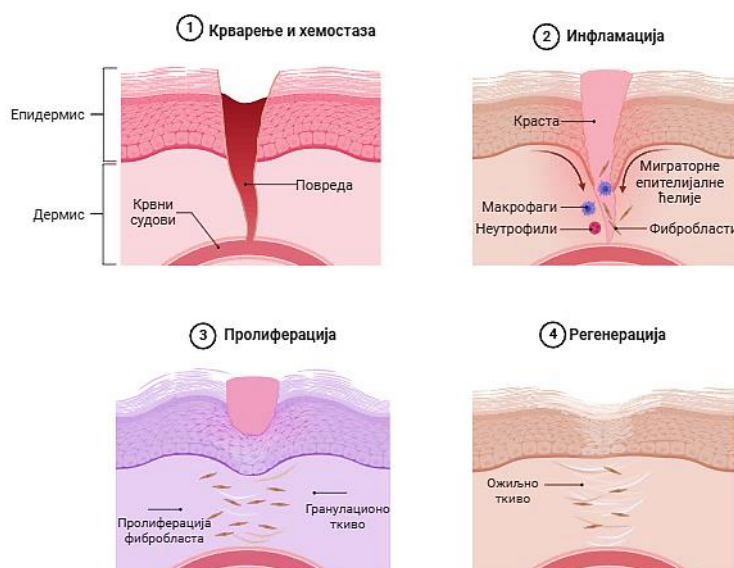
Најдубљи слој коже чини хиподермис, који је варијабилне дебљине у различитим деловима тела. Састоји се од масних ћелија груписаних у лобулусе, који су раздвојени међусобно добро васкуларизованим и инервисаним везивним септама. (204) Поред своје улоге хиподермис служи и као топлотни изолатор, али као и депо енергетског материјала, који повезује кожу са мишићима и костима. Може да садржи и дубље фоликуле длаке и лојне жлезде.

1.6.2 Зарастање рана

У савременој медицини, употреба биоматеријала у облику скефолда добија све већи значај у третману различитих оштећења коже. Такви носачи се све чешће користе у лечењу пацијената са акутним опекотинама, као и код хроничних упалних рана као што су венски чиреви, дијабетички чиреви и декубитуси. У клиничкој пракси су доступне бројне кожане замене, које побољшавају функцију ткива, али још увек су њихове способности да потпуно регенеришу оштећену кожу и даље ограничени. (205)

Зарастање ране је репаративни одговор организма на повреду. (206) Процес зарастања ране подразумева активацију више биолошких механизма и одвија се у неколико фаза (Слика 20):

1. Хемостаза
2. Инфламација
3. Пролиферација
4. Ремоделовање



Слика 20. Шематски приказ фаза регенерације коже. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

1.6.2.1 Хемостаза

Процес зарастања ране започиње фазом хемостазе, чија је главна улога да заустави крварење настало оштећењем крвног суда. Ова фаза обухвата више повезаних корака: вазоконстрикцију, стварање тромбоцитног чепа, коагулацију (формирање крвног угрушка) и стабилизацију крвног угрушка или његово разлагање. (207) Као први одговор на повреду, активира се симпатички нервни систем, што доводи до контракције глатких мишићних ћелија у зиду крвних судова и последичног смањења дотока крви, односно вазоконстрикције. (208), (209) У исто време компоненте оштећеног васкуларног зида (ламинин, фибриноген, колаген) подстичу адхезију тромбоцита посредством рецептора. Фон Вилебрандов фактор, који ослобађају и ендотелне ћелије и тромбоцити, омогућава да се тромбоцити вежу за колаген, али и међусобно, чиме се гради почетна линија одбране - тромбоцитни чеп.

Активацијом тромбоцита започиње и ослобађање различитих сигналних молекула попут аденозин дифосфата (ADP), серотонина и тромбосана A₂, који даље стимулишу агрегацију тромбоцита формирајући тромбоцитни чеп. (210) Истовремено, активира се коагулациони каскадни систем, у оквиру ког се фибриноген претвара у фибрин. Молекули фибрина се скупљају на оштећеној површини суда формирајући угрушак.

Угрушак служи као привремена баријера, која штити изложено ткиво ране и обезбеђује привремени матрикс за миграцију ћелија у хемостатској и инфламаторној фази. (207) Угрушак такође функционише као резервоар за цитокине и факторе раста, који се могу ослободити након дегранулације активираних тромбоцита. Тромбоцити садрже α -грануле напуњене факторима раста и цитокинима, као што су трансформирајући фактор раста бета (TGF)- β , тромбоцити фактор раста (PDGF), епидермални фактор раста (EGF) и фактори раста слични инсулину (IGF). (211) Ово су важни фактори, јер покрећу каскадни процес зарастања ране активирањем и привлачењем неутрофила, макрофага, ендотелних ћелија и фибробласта. (212)

1.6.2.2 Инфламација

Инфламаторна фаза представља одбрамбени механизам организма којим се успоставља имунолошка баријера против микроорганизама. (213) Убрзо након повреде, на место ране пристижу полиморфонуклеарне ћелије, пре свега неутрофили, чија је основна улога борба против микроба. У окружењу ране, неутрофили фагоцитирају антигени материјал и бактерије, елиминишући их ослобађањем протеолитичких ензима и реактивних врста кисеоника. Поред тога, они су значајан извор проинфламаторних цитокина, као што су интерлеукини IL-6, IL-1 α и IL-1 β и туморски фактор некрозе алфа (TNF- α), који додатно појачавају антиинфламаторни одговор. (213)

Активност неутрофила је краткотрајна и престаје након неколико дана, а вишак ћелија се уклања или се врши екструзија на површину ране од стране макрофага. Доласком моноцита, обично након 2-3 дана, започиње друга фаза инфламаторног процеса. Моноцити се у ткиву активирају и прерастају у макрофаге, који осим што настављају процес чишћења ране, представљају и кључни извор фактора раста. Ови фактори стимулишу активацију и пролиферацију кератиноцита, фибробласта и ендотелних ћелија, који учествују у формирању ванћелијског матрикса и покретању неоангиогенезе. (214)

1.6.2.3 Пролиферација

Пролиферативна фаза ране је усмерена на обнављање епителне баријере, формирање новог гранулативног ткива и поновно успостављање васкуларизације. (215) Током процеса реепителизације, ћелије епидермиса, које потичу из околних слојева коже активно учествују у отклањању оштећене строме и остатака коагулисане крви из ране. Упоредо са овим процесом, епителне ћелије подлежу фенотипској модулацији током које губе интермедијарне тонофиламенте и експримирају актинске филаменате, који омогућавају њихово кретање и миграцију. (216)

Разграђивањем епидермиса и базалне мембране, престаје директна комуникација између епидермалних и дермалних ћелија, што омогућава бочно кретање епителних ћелија. Те ћелије почињу да експримирају интегринске рецепторе, који им омогућавају интеракцију са различитим компонентама ванћелијског матрикса. (217)

Након четвртог дана од настанка повреде, локални фибробласти почињу да имигрирају на место ране. Фибробласти се брзо размножавају и синтетишу матриксне

протеине – фибронектин, хијалуронску киселину, протеогликани и колаген, који представљају основу за нови матрикс гранулационог ткива. (218) Након тога, ванћелијски матрикс се обнавља, што омогућава миграцију ћелија унутар ране. У овој фази, фибробласти се диференцирају у миофибробласте, који садрже дебеле актинске снопове испод плазмалеме. Ове ћелије развијају своје продужетке помоћу којих се везују за фибронектин и колаген, и доприносе скупљању и затварању ране. По завршетку ове улоге, миофибробласти и остали сувишни фибробласти се елиминишу путем апоптозе. (219), (220)

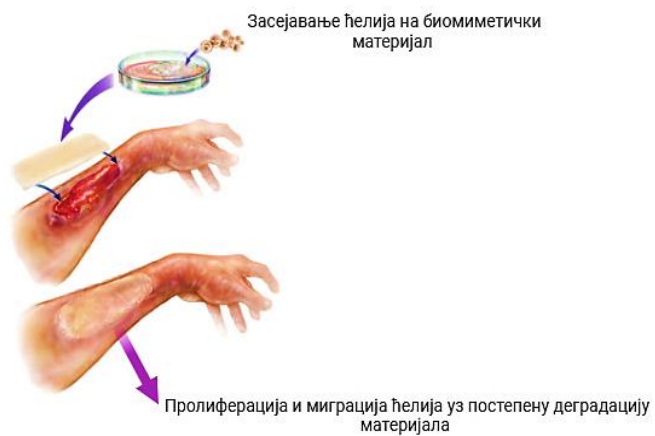
1.6.2.4 Регенерација

Ремоделовање представља завршну фазу процеса зарастања рана, током које долази до завршне реепителизације и формирања ожиљка. (218), (221) У овој фази, ванћелијски матрикс се активно ремоделује захваљујући сталном процесу синтезе и разградње колагена. Иницијално се у гранулационом ткиву депонује колаген типа III, који фибробласти временом замењују механички стабилнијим колагеном типа I, чиме се постепено повећава затезна чврстоћа ткива. (216) У завршним фазама ремоделовања, долази до организације колагенског матрикса и контракције саме ране. Овај процес доводи до смањења површине ране, јер се везивно ткиво скупља и приближава ивици ране. Паралелно томе, капиларни раст се зауставља, метаболичка активност унутар ране опада, а број макрофага и фибробласта се редукује путем апоптозе. Крајњи резултат је формирање зрелог ожиљка, који поседује мању затезну чврстоћу у односу на здраву, неоштећену кожу. (213)

Начин лечења кожных лезија зависи од дубине и површине ране. Мања оштећења, као што су површинске и делимичне ране, обично зарастају у периоду од две до три недеље. Насупрот томе, опекотине представљају изазов у области пластичне и реконструктивне хирургије, јер изазивају дубока оштећења, укључујући и васкуларну структуру испод епидермиса. (222)

Зарастање дијабетичких улкуса стопала се значајно разликује од нормалног процеса зарастања и показује поремећај у свим фазама регенерације ткива. Зарастање таквих рана зауставља се у фази инфламације или ћелијске пролиферације. (223) Ово доводи до инфекције и упале, што додатно одлаже процес зарастања. Поред тога, долази до дисбаланса у регулацији екстрацелуларног матрикса, а активност фактора раста који су неопходни за нормално зарастање је значајно смањена.

У случају дубоких и обимних рана, попут опекотина и дијабетичких чирева, применом савремених биоматеријала могуће је знатно унапредити процес регенерације ткива. (224) Бројна истраживања показују да морфолошке, топографске и механичке карактеристике скефолда обезбеђују оптимално микроокружење за ћелије укључене у процес зарастања, чиме се подстиче и убрзава регенерација ткива. (225) (Слика 21).



Слика 21. Процес регенерације коже уз примену биомиметичких материјала (Извор: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780081021927000102>, модификовано)

2 ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

2.1 Хипотезе истраживања

- Оптимизација параметара раствора и процеса електроспининга доводи до контролисане морфологије влакана, што омогућава добијање оптималне комбинације скефолда за примену у биомедицини.
- Комбинација полимера PCL/PEG у одређеним концентрационим односима омогућава синтезу биокомпатибилних скефолда, који имитирају екстрацелуларни матрикс коже и омогућавају адхезију и пролиферацију ћелија.
- Пречник влакана значајно утиче на механичка својства скефолда, при чему мањи пречник побољшава механичке карактеристике и биокомпатибилност.
- AI модели могу предвидети оптималне параметре за синтезу нановлакна, што смањује потребу за експерименталним радом и убрзава процес добијања функционалних материјала.
- Синтетисани скефолди базирани на природним и синтетичким полимерима показују изузетну биокомпатибилност функционалност у *in vitro* и *in vivo* условима
- Двослојни хидрофилно-хидрофобни скефолди боље oponaшају структуру коже, што их чини погодним за примену у ткивном инжењерингу.

2.2 Специфични циљеви истраживања

- Оптимизовати састав раствора полимера и параметре процеса електроспининга, како би се добила влакна различитих морфологија погодна за примену у регенерацији ткива.
- Анализирати морфолошке карактеристике добијених влакана користећи светлосну и електронску микроскопију.
- Користити AI модел за предвиђање параметара електроспининга и синтезе влакана на основу експерименталних података.
- Истражити механичка својства и хемијску структуру синтетисаних влакана коришћењем AFM и FTIR анализа.
- Анализирати биолошку активност влакана кроз *in vitro* и *in vivo* експерименте.
- Развити и оптимизовати двослојне скефолде са хидрофилним и хидрофобним својствима, погодне за примену у ткивном инжењерингу.

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експериментални део истраживања у оквиру ове дисертације спроведен је у Лабораторији за биоинформатику и примењену биологију, Института за информационе технологије Крагујевац, Универзитета у Крагујевцу. Истраживање је спроведено у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (пројекат број III41007).

3.1 Хемикалије и реагенси

У овом истраживању су коришћени различити типови полимера и растварача.

Све хемикалије коришћене у овом истраживању су аналитичке чистоће. Поли(капролактон) (PCL) ($M_r \sim 80,000$), поли(етилен)гликол (PEG) ($M_r \sim 4,000$), желатин из свињске коже (Type A), хитозан (средње молекулске масе) и полилактидна киселина (PLA) ($M_w \sim 60,000$) су купљени од Sigma Aldrich. Хлороформ ($CHCl_3$) од Macron Fine Chemicals, док је N,N-диметилформамид (DMF) је набављен од Fisher Scientific. Dulbecco's Eagle Medium (DMEM), 1% антибиотик пеницилин/стрептомицин, 10% фетални говеђи серум (FBS) и 0.25% трипсин EDTA су купљени од Sigma-Aldrich. Диметил сулфоксид (DMSO) и глацијална сирћетна киселина (AcA) су од произвођача Fisher Chemical, (MTT) (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолијум бромид) од Acros Organics. Фосфатни физиолошки раствор пуфера (PBS) је добијен од GIBCO, Invitrogen, SAD. Антибиотски агенси ципрофлоксацин и гентамицин сулфат су од произвођача Fujian Fukang Pharmaceutical, Кина. Раствор глутаралдехида (50% глутаралдехида у H_2O) је добављен од Sigma-Aldrich.

Коришћене комбинације полимерних раствора су приказане у **Табели 3**.

Табела 3. Формулације раствора полимера коришћених у овом истраживању.

Типови полимерних раствора	Хемијска формулација
Синтетички	21% PCL:PEG (70:30) у $CHCl_3$:DMF (70:30)
Природни (протеини)	Желатин у 70% у CH_3COOH : 9% DMSO
Природни (полисахариди)	Хитозан/PLA у CH_3COOH : $CHCl_3$ (1:1)

Предтретман и експериментални поступци су обављени према Европској директиви за добробит лабораторијских животиња (Директива 2010/63/EU), по одобрењу Етичке комисије Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Србија (Студија бр. 01-6121 од 27.07.2020.године).

3.2 Део 1. Синтетички скефолди.

3.2.1 Data mining анализа

Пре самог почетка истраживања, била је спроведена анализа методологије из високо цитираних радова из области полимерних нановлакана у ткивном инжењерингу на платформи PubMed. Скуп релевантних кључних речи и синонима за прецизирање претраге су били дефинисани као:

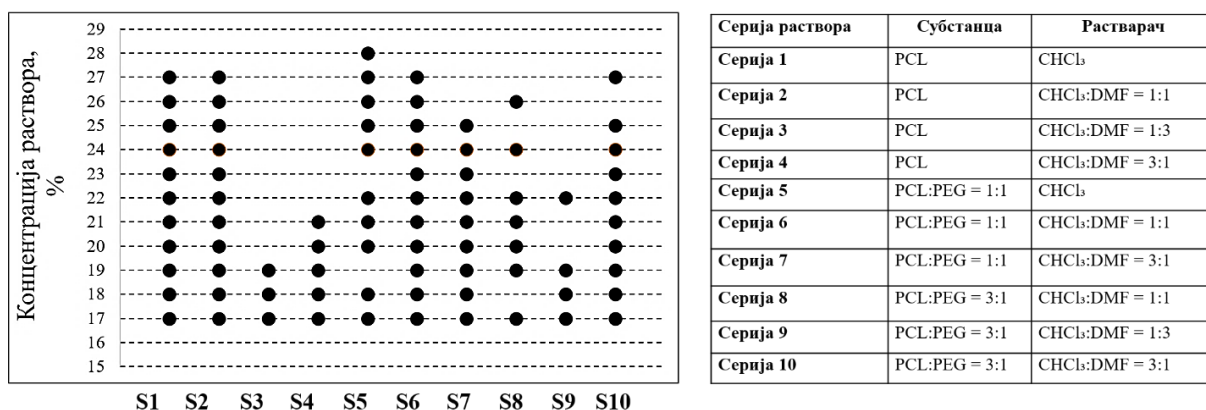
1. „Електроспининг“ (ES)
2. „Електроспининг” + „Поликапролактон” + „Полиетилен гликол” (ES+PCL/PEG)
3. „Електроспининг“ + „Инжењеринг ткива“ (ES+TE)
4. „Електроспининг“ + „Зарастање рана“ (ES+WH)
5. „Електроспининг“ + „Вештачка интелигенција“ + „Неуронске мреже“ (ES+AI/NN)

Анализа је обухватала научна истраживања у периоду од 2001. до 2022. године, како би се анализирао временски период у коме је проучавана област била актуелна. У оквиру методологије је спроведена мануална претрага литературе путем коришћења научних платформи као што су PubMed и Google Scholar. Иако је овакав начин претраге временски врло захтеван, он је омогућио детаљан преглед најрелевантнијих радова у овој области.

Током анализе објављених студија које се баве истраживањем електроспинованих материјала, најраспрострањеније технике које су биле коришћене за испитивање материјала су биле: лабораторијски експерименти засновани на *in vitro* и *in vivo* моделима (ћелијске културе и животиње), синтеза и карактеризација различитих типова полимера коришћењем микроскопије, мерења пречника влакана, механичких својстава (затезна чврстоћа, деформација), спектроскопских анализа и математичких модела. Након свеобухватне анализе, одабране су најрелевантније методе које су примењене у оквиру овог истраживања.

3.2.2 Припрема раствора полимера

За припрему синтетичких нановлакана је припремљено 125 узорак раствора полимера, подељених у 14 различитих група, користећи само један или комбинације синтетичких полимера PCL/PEG и растварача CHCl_3 или комбинација CHCl_3 и DMF. У **Шеми 1** су наведене све компатибилне комбинације полимер-растварач за процес електроспиновања. Направљени раствори су хомогенизовани мешањем на 1000 rpm, и остављени 24 сата на собној температури. Од ових узорака, 81 је успешно електроспиновано, што чини 10 серијских група. Преостале 44 комбинације у 4 групе нису биле погодне за процес електроспиновања.



Шема 1. Комбинације полимера и растварача за процес електроспининга. Полимери су растворени у масеним концентрацијама од 17 до 28% у CHCl₃ или комбинацији растварача CHCl₃ и DMF.

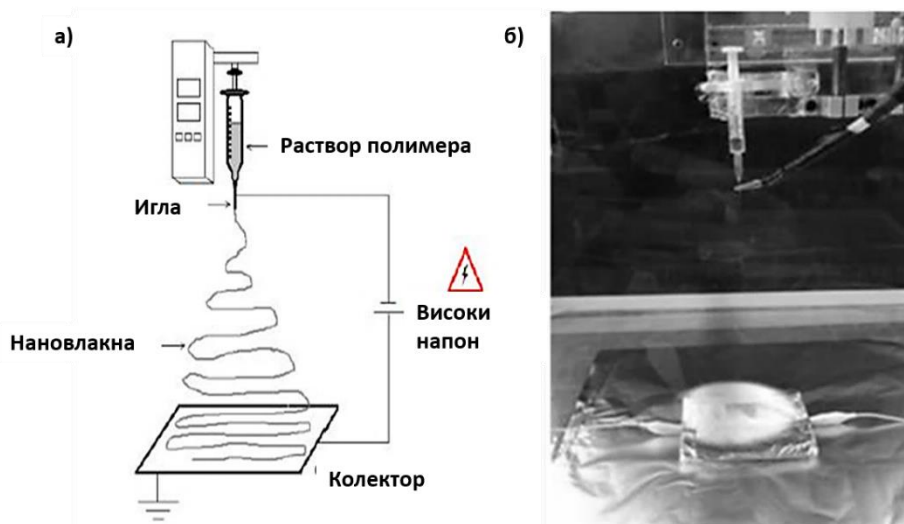
Употреба модела вештачке интелигенције је открила да би додатне три серије раствора полимера могле бити погодне за добијање нових електроспинованих влакана. Додатних 26 узорака је електроспиновано и анализирано помоћу оптичког микроскопа.

Међутим, за даље експерименте је изабрана једна од комбинација, а затим једна најуспешнија концентрација из те групе. Раствор концентрације 22% (7:3) PCL:PEG у (7:3) CHCl₃:DMF је резултовао влакнима добре морфолошке структуре и одговарајуће дистрибуције пречника влакана, па је одабран за даља експериментална истраживања.

3.2.3 Процес електроспининга

Опрема за процес електроспининга је развијена од стране инжењера у Лабораторији за биоинжењеринг, Института за информационе технологије у Крагујевцу (Слика 22). Систем се састоји од прецизне пумпе повезане са шприцом и иглом величине 21G, "Acorian" високонапонског извора напајања и алуминијумског колектора за таложење влакана. Инкорпорација антибиотика ципрофлоксацина и гентамицина у влакна је извршена додавањем антибиотика у раствор полимера пре процеса електроспининга. Антибиотици су додати у концентрацији од 0.1% у 22% (w/v) раствор полимера PCL:PEG у масеном односу 7:3 припремљеном у мешавини растварача CHCl₃:DMF у запреминском односу 7:3.

Припремљени раствор је инјектиран у шприц од 5 mL и процес електроспининга је остварен уз радни проток од 1 mL/h, примењени напон од 21 kV и растојање између игле и колектора од 15 cm. Собна температура и влажност су контролисане током процеса, а добијена влакна су чувана у сувим, тамним условима да би се одржали структура и облик добијеног материјала.



Слика 22. а) Шематски приказ електроспининг процеса б) Извођење електроспининг процеса у лабораторији за биоинжењеринг

3.2.4 Морфолошка карактеризација влакана

Морфолошка карактеризација и расподела пречника влакана су извршене коришћењем инвертног микроскопа (Delta Optical Genetic PRO, Пољска) и скенирајућег електронског микроскопа (MIRA3 TESCAN, Чешка Република). Пречник влакана је анализиран помоћу софтверског програма ImageJ (верзија 1.48). Минималан број мерења по микрографији је износио 200, са циљем добијања што прецизније и статистички поузданије средње вредности пречника влакана. SEM анализа скефолда је спроведена при увећању од 1000 кх.

3.2.4.1 Морфолошка анализа скефолда са ADMSC ћелијском културом (SEM)

Добијена влакна су засејана мезенхималним адипозним матичним ћелијама добијеним из масног ткива (ADMSC) са циљем испитивања компатибилности матичних ћелија са скефолдом. Морфологија влакана и интеракција са култивисаним ADMSC ћелијама испитивана је помоћу скенирајуће електронске микроскопије (SEM). Скефолди су постављени на дно стерилне плоче са 6 бунарића и стерилисани под ултраљубичастом светлошћу (UV) у трајању од 2 сата. Након стерилизације, узорци су испрани физиолошким раствором фосфатног пуфера (PBS) и натопљени медијумом (DMEM) током 24 сата ради побољшања адхезије ћелија. Затим је ћелијска суспензија густине 100.000 ћелија по бунарићу је засејана на узорке скефолда. После неколико дана култивације, узорци су фиксирани са 2.5% глутаралдехида и остављени да стоје 48 сати на собној температури.

Након што је фиксација завршена, узорци су третирани према следећем протоколу:

1. 3% сирћетна киселина, 15 минута
2. 3% сирћетна киселина и 25% етанол у запреминском односу 1:1, 15 минута
3. 3% сирћетна киселина и 50% етанолу запреминском односу 1:1, 15 минута

4. 70% етанол, 15 минута
5. Узорци су чувани у 70% етанолу

Након фиксације, скефолди су осушени и анализирани помоћу SEM при напону од 10 kV.

3.2.4.2 Микроскопија атомских сила (AFM)

Метода наноидентације помоћу микроскопије атомских сила (AFM), спроведена је на NanoWizard ULTRA Speed систему (AFM, JPK Instruments AG, Берлин) монтираном на инвертованом оптичком микроскопу (Axio Observer.D1, ZEISS). Испитивања су изведена у сувим и хидратисаним условима (PBS). За обе врсте мерења је коришћена OTESPA-R3 конзола (Bruker, Billerica, Massachusetts) са оштрим троугластим врхом са радијусом врха мањим од 10 nm. Термичком методом је одређена вертикална константа опруге од 43.43 N/m и резонантна фреквенција од 291.6 Hz.

Припрема узорка је подразумевала постављање дела скефолда на предметно стакло и његово развлачење пинцетом у циљу добијања изолованих појединачних влакана. За сваку групу влакана (суви и хидратисани) одабрано је по осам индивидуалних влакана за мерење.

Криве силе су добијене коришћењем режима квантитативног приказа JPKs Quantitative Imaging (QI) мода, при чему су креиране мапе криве силе од 64×64 пиксела које покривају површину отприлике 2 μm дужине појединачног влакна. На овај начин добијено је довољно топографских информација, које служе да се лоцирају криве силе са самог врха влакана, чиме се минимизирају различити нежељени артефакти и дефекти индентације.

Добијене криве силе су затим анализирани на основу Херцовог модела индентације за параболоидне врхове, који повезују дубину индентације (δ) са реакционом силом (F) следећом једначином:

$$F = \frac{4E\sqrt{R}}{3(1-\nu)^2} x^{\frac{3}{2}} \quad (10)$$

Где је R радијус врха сонде, E модул еластичности материјала, а $\nu = 0.5$ Поасонов коефицијент.

Радијус врха конзоле (R) процењен је мерењем његовог облика и реконструисан применом деконволуције уз помоћ TGT-1 теста решетки (NT-MDT, Селеноград). Под претпоставком да је модул еластичности материјала врха значајно већи од оног код узорка, на овај начин добија се привидни модул еластичности (E) испитиваног влакна.

3.2.5 Модел вештачке неуронске мреже (ANN)

Ради бољег разумевања улазно-излазне динамике процеса електроспиновања при формирању влакана, у овом истраживању су примењене вештачке неуронске мреже (енгл. ANN – *Artificial Neural Network*) коришћењем софтвера MATLAB R2021a (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA). Модели вештачке неуронске мреже представљају поддисциплину вештачке интелигенције (AI), и опонашају структуру и функцију људског мозга са међусобно повезаним чворовима организованим у слојеве. Њихова примена је посебно ефикасна у задацима као што су препознавање образаца, класификација, регресија, као и у попуњавању недостајућих података у оквиру

експерименталних скупова, под условом да постоји довољна количина података. (226), (227)

У овом истраживању, ANN је коришћена за анализу међусобног утицаја параметара процеса и формулација у циљу оптимизације пречника влакана. Предиктивни модел је креиран коришћењем MLP, вишеслојне перцептронске неуронске мреже (енгл. *MLP – Multilayer perceptron*) и алгоритма повратног ширења, који укључује и линеарне и лог-сигмоидне активационе функције. Као улазне варијабле у моделу су коришћене: концентрација раствора полимера, запремински односи компоненти у раствору, проток (mL/h) и примењени напон у интервалу од 15 до 30 kV. Ови параметри су значајно утицали на резултујући пречник влакана, који је представљао излазну вредност у моделу.

3.2.6 Гајење и засејавање ћелија

Здраве ћелије фибробласта плућа MRC-5 коришћене су за испитивање цитотоксичности и зарастање рана у *in vitro* условима. Ћелијске линије су добијене од American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) и култивисане у комплетном DMEM-у са додатком 10% FBS и 1% пеницилина/стрептомицина у инкубатору на 37°C са 5% CO₂. Након постизања 70-80% конфлуентности, ћелије су подигнуте са 0.25% трипсина-EDTA и спремне за засејавање.

3.2.6.1 Испитивање степена апсорпције и деградације

Тест деградације је један од примарних тестова за процену биоразградивости полимерних материјала. Заснива се на гравиметријској основи која дефинише губитак масе испитиваног узорка израженог у процентима (%). Прерана ($t_d > t_h$) или прекомерно спора деградација ($t_d < t_h$) скефолда може негативно утицати на процес регенерације ткива. (228)

За потребе испитивања деградације, скефолди димензија 2.5 cm × 2.5 cm су испрани дејонизованом водом (dH₂O), а затим осушени у вакууму на собној температури. Након тога, скефолди су измерени на аналитичкој ваги и стављени у стерилну плочу са 6 бунарића, при чему је у сваки бунарић додато 10 mL PBS (pH=7.4). Узорци су инкубирани у физиолошким условима на 37°C и 5% CO₂. Тест деградације скефолда је трајао 3 недеље. Узорци су вађени у различитим временским интервалима (1. недеља, 2. недеља, 3. недеља), пажљиво осушени филтер папиром, измерени, и враћени у плочу.

Резултати губитка масе (%) добијени су према следећој једначини:

$$\text{Губитак масе (\%)} = (W_1 - W_0)/W_1 \times 100 \quad (11)$$

Где је W_0 сува маса узорка, а W_1 је маса деградираног узорка.

Дифузиона својства скефолда су одређивана на исти начин као код деградације, с тим што су скефолди мерени само у једном временском периоду од 24 сата.

Капацитет апсорпције воде израчунат је према следећој једначини:

$$\text{Апсорпција воде (\%)} = (W_w - W_d)/W_d \times 100 \quad (12)$$

Где је W_d маса сувог узорка, а W_w маса узорка након 24 сата у PBS.

3.2.6.2 Испитивање цитотоксичности и вијабилности

Цитокомпатибилност, пролиферација и виталност ћелија култивисаних на скефолдима су одређиване помоћу МТТ стандардизованог протокола (протокол Лабораторије за биоинжењеринг ЦБ-005). МТТ тест се заснива на употреби хемијског једињења (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолијум бромид), које представља жуту со тетразолијума растворљиву у води. Тетразолијумова со се метаболички редукује у ћелијама које имају функционалне митохондрије. Након тога се формирају кристали формазана који су нерастворљиви у воденом медијуму. Овако формиран кристали могу се растворити коришћењем DMSO, који их претвара у плаво-љубичасти производ - формазан. Интензитет апсорпције је пропорционалан броју вијабилних ћелија и омогућава индиректну процену ћелијске пролиферације и биокомпатибилности узорка.

Припремљени скефолди су испрани са 70% етанола и затим стављени под UV светлост у трајању од 2 сата. Након стерилизације, узорци су пажљиво премештени на дно стерилне плоче са 96 бунарића, при чему је додат DMEM-а ради преинкубације током 24 сата. Након тога, DMEM је уклоњен и скефолди су засејани MRC-5 ћелијама у концентрацији од 2.5×10^4 ћелија/100 μL по бунарићу. За позитивну контролу су узете ћелије које су засејане без скефолда.

Плоча је инкубирана на 37°C са 5% CO₂ у одређеним временским интервалима (24, 72 и 120 сати). Након инкубације, супернатант је уклоњен, а бунарићи су испрани са 2 mL PBS-а. Смеша МТТ раствора (25 μM , 5 mg/mL) и свеже припремљеног раствора DMEM-а додата је у сваки бунарић. Након одговарајућег времена инкубације, раствор је уклоњен и додато је 150 μL DMSO. Апсорбанца је мерена на 490 nm на ELISA Rayto спектрофотометру. Добијени резултати су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна грешка и статистички анализирани у циљу процене ћелијске вијабилности и биокомпатибилности скефолда.

3.2.6.3 Анализа антибактеријске активности

Антимикробна активност синтетисаних скефолда испитана је на грам-позитивној *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и грам-негативној бактерији *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Микроорганизми су обезбеђени из збирке Лабораторије за микробиологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Антибактеријска активност скефолда са и без антибиотика тестирана је против два стандардна соја бактерија. Као позитивне контроле коришћени су филтер папири са гентамицином (1mg/mL) и ципрофлоксацином (1mg/mL).

Припрема бактеријских суспензија и испитиваних материјала

Бактеријске културе су прво култивисане на хранљивом агару, а затим инкубиране 18-20 сати на 37°C да би се обезбедили оптимални услови раста. Бактеријске суспензије су затим припремљене методом директне колоније, при чему је замућеност суспензије подешена на McFarland 0,5 што одговара 10^8 CFU/mL, коришћењем дензитометра (DEN-1, BioSan, Латвија). Ове суспензије су припремљене непосредно пре експеримента, јер се препоручује да се користе у року од 15 минута након припреме. Скефолди су исечени у цилиндри пречника 8 mm, док је пречник филтер папира износио 5 mm.

Метода диск-дифузије

Осетљивост бактерија на испитиване скефолде и стандардне антибиотике испитивана је *in vitro* методом диск-дифузије. Тест диск-дифузије је изведен у Петријевој шољи на Mueller–Hinton агару (25 mL медијума по плочи). Скефолди са и без инкорпорисаних антибиотика, заједно са дисковима од филтер папира који садрже антибиотике, постављени су на површину медијума (3 идентична скефолда/филтер папира по 1 плочи), на којој се налази чиста бактеријска суспензија са $1-2 \times 10^8$ CFU/mL. Након инкубације (16–24 сата), мерен је пречник зоне инхибиције (површина зоне инхибиције раста бактерија). Добијене вредности су упоређене са EUCAST стандардом (229) Све зоне инхибиције су израчунате у три поновка.

3.2.6.4 Зарастање рана у *in vitro* условима (скреч есеј)

Испитивање зарастања рана у *in vitro* условима (тзв. скреч есеј, енгл. *Scratch – огреботина*) је спроведено у складу са модификованим протоколима описаним у литератури (230). (231) Стерилна плоча са 6 бунарића је коришћена за засејавање MRC-5 ћелијске суспензије густине од 5×10^4 по бунарићу. Ћелије су инкубиране 24 сата на 37°C и 5% CO₂, све до постизања 80-90% конфлуентности.

Након тога, у сваком бунарићу направљена је огреботина коришћењем стерилног врха пипете од 10 µL како би се направила област без ћелија, која симулира рану. Претходно стерилисани узорци скефолда су додати у сваки бунарић са ћелијском културом и одржаване у физиолошким условима.

Миграција ћелија у зону огреботине праћена је оптичког микроскопа у две временске тачке: на 0 сати и након 24 сата након постављања скефолда. Софтверски пакет ImageJ је коришћен за мерење растојања, односно зарастања ране. Проценат зарастања ране израчунат је према следећој једначини:

$$\text{Зарастање ране (\%)} = (W_0 - W_d)/W_0 \times 100 \quad (13)$$

Где су W_0 је растојање на 0 сати, а W_d растојање измерено након 24 сата.

3.2.7 *In vivo* тест хориоалантоичне мембране пилећег ембриона (CAM)

тест (енгл. CAM – *Chorioallantoic Membrane*) је спроведен у контролисаним условима са константном температуром од 37°C и релативној влажности од 70%, уз стабилан проток ваздуха унутар ламинарне коморе. Укупно 24 оплођена јаја била су укључена у експеримент и подељена у четири групе: контролна, PCL/PEG,

PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин и PCL/PEG/0.1% гентамицин скефолди. Цео експериментални процес је представљен на **Слици 23**.

Поступак је обухватио следеће кораке:

Избор јаја: Оплођена кокошја јаја стара 10 дана са нетакнутом љуском, добро постављене ваздушне кесе, развијене мреже крвних судова, као и знацима живих ембриона. Ове карактеристике су потврђене помоћу свеће која је коришћена за верификацију (**Слика 23А**).

Дезинфекција јаја: Горњи и доњи делови одабраних јаја су били дезинфиковани помоћу 10% раствора јода (**Слика 23Б**).

Отварање јаја: На дну јаја је пажљиво избушена рупа како би се ослободио албумин. Врх љуске јајета је уклоњен стерилним маказама, при чему је важно да САМ мембрана остане неоштећена и добро повезана са унутрашњим садржајем јаја (**Слика 23В**).

Инокулација: Аликвот од 50 μL стерилног PBS-а је додат у хориоалантоичну мембрану кроз рупу направљену стерилном иглом. Истог дана све групе скефолда, са и без антибиотика су пажљиво помоћу пинцете апликоване унутар хориоалантоичне мембране. Сва третирана јаја су покривена филм траком (**Слика 23Г**).

Инкубација: Јаја су инкубирана на константној температури од 37°C 5 дана, до 15. дана од оплодње (**Слика 23Д**).

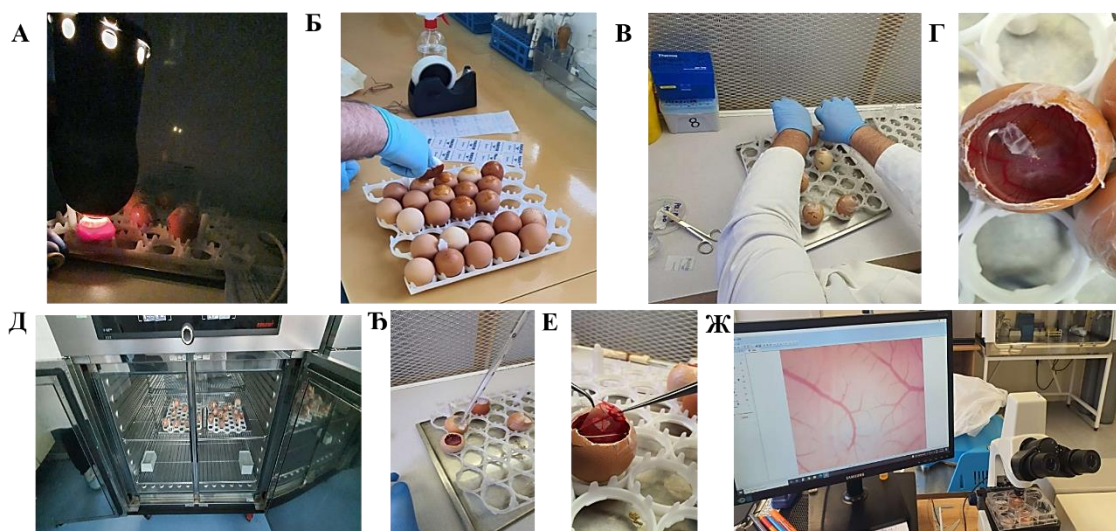
Дневна анализа: Јаја су свакодневно прегледана ради праћења развоја ембриона и откривања могуће контаминације. Контаминирана јаја и мртви ембриони су одвојени и одложени у специјално место за одлагање.

Жртвовање и фиксација: Живи третирани ембриони су жртвовани на 15. дан стављањем јаја у дубоко замрзавање на -80°C у трајању од 10 мин. Провидна трака је уклоњена, а фиксација је урађена са 4% раствором параформалдехида (PFA) (**Слика 23Ђ**).

Припрема САМ мембране: САМ мембрана је пажљиво одсечена око унутрашњих ивица и пребачена у плејт са 6 бунарића (**Слика 23Е**).

Микроскопска анализа: Сlike добијених мембрана након третмана снимљене су помоћу оптичког микроскопа (**Слика 23Ж**).

Анализа крвних судова: Број формираних крвних судова је био одређен из добијених слика коришћењем програма ImageJ.



Слика 23. Процедура САМ анализе пилећег ембриона: А) Одабир јаја Б) Дезинфекција јаја са 10% раствора јода В) Инокулација и припрема за имплантацију скефолда Г) Инкубација јајета Д) Свакодневно праћење развоја ембриона и могуће контаминације Ђ) Жртвовање третираних ембриона и фиксација са 4% раствором PFA Е) Припрема САМ мембране Ж) Снимање и евалуација слике крвних судова

3.2.8 Зарастање рана у *in vivo* условима

У *in vivo* истраживању коришћени су мужјаци Wistar albino пацова, старости од 6 до 8 недеља. Животиње су биле смештене у конвенционалним условима уз одговарајућу дозвољену лабораторијску храну и воду. Пацови су подељени у четири експерименталне групе, при чему је свака група обухватала по три јединке ($n=3$). Једна група животиња ($n=3$) је била изложена опекотинама и није даље лечена (контрола), друга група ($n=3$) третирана је само скефолдом, трећа група скефолдом са инкорпорисаним ципрофлоксацином, а четврта ($n=3$) скефолдом са инкорпорисаним гентамицином. Процес изазивања опекотина код пацова обављен је према протоколима раније објављене студије. (232)

Пацови су анестезирани интраперитонеалним кетамином (10 mg/kg телесне тежине) и ксилазином (5 mg/kg телесне тежине) пре него што су изазване опекотине. Леђа здравих пацова обријана су кремом за депилацију. Ране су дебљине 2×2 cm извршене коришћењем усијане металне плоче притиснуте на кожу у трајању од 10 секунди. Настале ране су прекривене припремљеним скефолдима (димензија 2×2 cm). Процес зарастања опекотина је праћен 7 дана, уз свакодневну замену скефолда.

Хистопатолошки преглед

Одређивање степена регенерације оштећене коже испитивано је хистопатолошком анализом. Сви пацови су жртвовани путем цервикалне дислокације 7. дана након спаљивања. Кожа је асептично уклоњена и фиксирана у 10% пуферованом формалин фиксатору преко ноћи. Након дехидрације кроз повећање концентрације алкохола, узорци ткива су пребачени у парафин (5 μ m) и обојени хематоксилином и еозином (Х&Е), а обојена предметна стакла су затим анализирана под светлосним микроскопом да би се проценио степен оштећења.

3.3 Део 2. Протеински скефолди

3.3.1 Припрема раствора желатина

Испитивано је пет различитих комбинација раствора желатина. Раствори полимера желатина су представљени као желатин у систему ко-растварача сирћетне киселине (AcA) и DMSO са различитим распонима концентрација и запреминских односа (Слике 16-20П у Прилогу). За даља истраживања утврђено је да је најоптималнија комбинација за ефикасну производњу влакна је раствор 23% желатина у смеши растварача 70% AcA и 9% DMSO (93:7) (Табела 4). Инкорпорисање антибиотика ципрофлоксацина и гентамицина у влакна је извршено на исти начин као код PCL/PEG раствора.

Добијени хомогени раствори су мешани помоћу магнетне мешалице (IKA Digital Color Squid, Fisher Scientific, USA) на 40°C током 1 сата, а након тога пребачени у шприц од 5 mL са 18G иглом. Електроспиновање је изведено под контролисаним условима постављеним на напон од 15 kV и брзину протока од 0.15 mL/h. Растојање између врха игле и колектора је износило 15 cm. Влакна су сакупљена на колекторској плочи прекривеној алуминијумском фолијом. Бели поравнати танак слој (дебљина је приближно 2 mm на алуминијумском колектору) влакана је исечен на квадрате 2×2 cm и чуван на тамном месту за даља испитивања.

Табела 4. Параметри процеса електроспининга и средња вредност пречника влакана пре процеса умрежавања.

Параметри раствора		Параметри електроспининг процеса				Параметри влакана
Концентрација желатина	AcA/DMSO (v/v%)	Напон (kV)	Проток (mL/h)	Димензије игле (gauge)	Растојање између колектора и игле (cm)	Средња вредност пречника (nm)
23%	70% AcA: 9% DMSO (93:7)	15	1.2	18	15	375.5 ±121.5

3.3.2 Процес умрежавања (crosslinking)

Хемијска структура желатина обилује хидрофилним групама, као што су хидроксилне и карбоксилне групе, па се добијени електроспиновани скефолди растварају у воденој и физиолошкој средини, губећи механичка својства и структурну стабилност. Због тога је неопходно побољшање отпорности влакана уколико се ради о практичној примени. Уобичајена стратегија укључује употребу тзв. *crosslinking* процеса (engl. *Crosslinking* – *умрежавање*) за стабилизацију структуре скефолда. У овом истраживању, хемијско умрежавање је спроведено излагањем скефолда засићеној пари раствора глутаралдехида (GA) (25% v/v водени раствор) током 6 сати. Након тога, узорци су чувани у условима вакуума на собној температури 120 сати, да би се уклонио преостали садржај растварача.

3.3.3 Утицај киселости и pH вредности влакана на физиолошку средину

Иако током процеса електроспининга долази до испаравања растварача, остатак резидуалног дела растварача је потребно испитати уколико се скефолди примењују у

тивном инжењерингу. Сирћетна киселина, као слаба киселина, може утицати на рН скефолда и последично утицати на понашање и вијабилност ћелија.

Промене рН вредности у медијуму након третмана са скефолдима су испитиване након 24 и 72 сата у физиолошким условима на 37°C, 5% CO₂. Поред тога, испитивани су и скефолди са инкорпорисаним антибиотским агенсима на рН вредност медијума. Процена је извршена коришћењем дигиталног рН метра (ROTH, AL10PH HAND-HELD-METER) са просечним вредностима добијеним из најмање три мерења за сваки раствор.

3.3.4 Морфолошка карактеризација влакана

Процес анализе је исти као у одељку 3.2.4

3.3.4.1 SEM анализа

Пре анализирања, узорци скефолда су исечени на мале квадрате, пресвучени златом и анализирани помоћу SEM-а. Анализа је спроведена при различитим увећањима, са напоном убрзања на 15 kV у трајању од 3 минута.

3.3.5 FTIR и EDS анализа

Присуство кристалних фаза у узорцима утврђено је трансмисијском инфрацрвеном спектроскопијом (преносиви FTIR/FT-NIR спектрометар Interspec 301-X) у спектралном опсегу између 400 и 4000 cm⁻¹ са 20 скенирања по узорку, у резолуцији од 2 cm⁻¹. Прашкасти узорци су припремљени мешањем са KBr у односу 1:100, док су електроспинована влакна испитивана у оригиналном облику. EDS анализа је извршена ради одређивања елементарне дистрибуције ципрофлоксацина и гентамицина у влакнима желатина.

3.3.6 Испитивање степена апсорпције и деградације

Процес је исти као у одељку 3.2.6.1

3.3.7 Испитивање цитотоксичности и вијабилности

Процес је исти као у одељку 3.2.6.2

3.3.8 Анализа антибактеријске активности

Процес је исти као у одељку 3.2.6.3

3.3.9 *In vivo* тест хориоалантоичне мембране пилећег ембриона (CAM)

Процес анализе је исти као у одељку 3.2.7

3.3.10 Зарастање рана у *in vivo* условима

Процес анализе је исти као у одељку **Error! Reference source not found.**

3.4 Део 3. Полисахариди

3.4.1 Припрема раствора полимера хитозана

Експериментални део синтезе скефолда је базиран на комбинацији хитозана и PLA, где је опсег концентрација за хитозан износио 0.01-0.05%, док концентрација PLA раствора је била у опсегу 15-27%. Укупно је било направљено 65 комбинација. Раствор полимера, који је показао најбоље перформансе за стварање влакана, као и за даља истраживања је 22% PLA растворен у CHCl_3 и 0.01% хитозан растворен у 90% АсА у запреминском односу 1:1. Добијени раствор је мешан на 750 rpm током 24 сата на собној температури. Након потпуне хомогенизације, раствор је спреман за процес електроспининга. Инкорпорисање антибиотика ципрофлоксацина и гентамицина у влакна је било извршено на исти начин, као и код претходних полимера.

Добијена хитозан/PLA емулзија је инјектирана у шприц од 5 mL са иглом од 21G са примењеним напоном од 17 kV. Удаљеност између врха игле и металног колектора је била подешена на 15 cm. Проток је износио је 0.1 mL/h^{-1} . Основни атмосферски услови као што су собна температура и влажност средине су били утврђени пре него што је процес спроведен. Нановлакна су сакупљена на алуминијумској фолији која је причвршћена за колекторску плочу. Добијена нановлакна су чувана у сувим мрачним условима.

3.4.2 Морфолошка карактеризација влакана

Процес израде је идентичан ономе што је описано у одељку 3.2.4

3.4.3 FTIR анализа

Процес анализе је исти као у одељку 3.3.5

3.4.4 Испитивање степена апсорпције и деградације

Процес анализе је исти као у одељку 3.2.6.1.

3.4.5 Испитивање цитотоксичности и вијабилности

Процес анализе је исти као у одељку 3.2.6.2.

3.4.6 Анализа антибактеријске активности

Процес анализе је исти као у одељку 3.2.6.3.

3.4.7 Зарастање рана у *in vivo* условима

Процес анализе је исти као у одељку 3.2.8

3.4.8 Статистичка анализа

Сви подаци су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка (SE). ANOVA тест је коришћен за одређивање статистичке значајности. Величина корелације између варијабли израчуната је коришћењем SPSS статистичког софтверског пакета (Chicago, IL, SAD) (SPSS за Windows, вер.17, 2008).

4 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1 Део 1. Синтетички скефолди

4.1.1 Data mining анализа

У сврху прегледа досадашњих истраживања у области ткивног инжењеринга, спроведена је детаљна анализа научно-истраживачких студија. Претрага је извршена помоћу неколико кључних термина: (1) електроспининг (ES), (2) електроспининг у комбинацији са PCL (поликапролактон) или PEG (полиетиленгликол), (3) електроспининг и зарастање рана (ES+WH), и (4) електроспининг, вештачка интелигенција и неуронске мреже (ES+AI+NN). Овим приступом обухваћени су широки аспекти истраживања – од традиционалних методологија до савремених иновативних приступа – чиме је омогућен свеобухватан увид у актуелна научна достигнућа у овој области.

Из сваке тематске групе издвојено је највише 20 најцитиранијих радова, а за анализу су узети у обзир њихова методологија и импакт фактор (IF) часописа у коме су објављени. На основу анализе идентификовано је пет главних методолошких праваца: електроспининг, карактеризација влакана, примена вештачке интелигенције, *in vitro* и *in vivo* методе. За групу усмерену искључиво на област ES, број цитата се кретао од 613 до 3216, при чему је просечан IF часописа износио 5.5. За комбинацију ES са PCL/PEG, број цитата се кретао од 52 до 775, уз значајно виши IF од 8.9. Група везана за област истраживања ES+WH имала је цитате у опсегу од 112 до 1266, уз још већи IF од 9.8, што указује на изузетно висок академски интерес. Насупрот томе, истраживачки радови из групе ES+AI+NN су поседовали знатно мањи број цитата, у опсегу од 0 до 58, што указује на недовољно истражену фазу развоја ове интердисциплинарне области. Просечан IF часописа у којима су обављени радови из ове групе износи 4.3, што указује на то да се ради о новој теми са значајним потенцијалом за будући научни напредак.

Анализа објављене литературе је показала да је електроспининг и даље веома популарна и заступљена метода за добијање влакана у ткивном инжењерингу, са просечно 1350 објављених радова годишње у последњој деценији. Истраживања која обухватају комбинације група, као што су ES+PCL/PEG, ES+TE и ES+WH објављивана су у обиму од 82, 450 и 1237 публикација, респективно.

Са друге стране, примена вештачке интелигенције у области оптимизације биоматеријала представља нов правац са свега осам радова објављених у периоду од 2013. до краја 2022. године. Занимљиво је да нису пронађене студије које комбинују AI методе за оптимизацију биокompatibilних материјала са детаљном карактеризацијом влакана уз *in vitro* и *in vivo* методе.

У оквиру овог истраживања, развијен је широк спектар синтетичких полимерних узорака укључујући комбинације PCL, PEG и PCL/PEG са растварачима CHCl_3 и DMF. Модел заснован на вештачкој интелигенцији примењен је ради предвиђања оптималне формулације раствора, а један од добијених скефолда је одабран за даља *in vitro* и *in vivo* испитивања.

Експериментални део је започет припремом 14 различитих комбинација PCL/PEG полимера, са концентрацијама раствора у распону од 17% до 28%. Од наведених формулација, десет серија (са укупно 81 узорком) показало је одговарајући вискозитет и кондуктивност који су неопходни за успешан процес електроспининга, који представља кључни корак у развоју модела заснованог на вештачкој интелигенцији (AI).

Са друге стране, четири серије (укупно 44 узорка) нису задовољиле критеријуме потребне за процес електроспининга, што је детаљно приказано у **Табели 5**. Ова почетна

фаза скрининга је значајно допринела одабиру најбољих формулација за даље истраживање.

Табела 5. Хемијски састав и дистрибуција пречника влакана иницијално синтетисане серије од 14 полимерних комбинација

Серија	Хемијски састав	Дистрибуција пречника влакана, nm
Серија 1	PCL у CHCl_3	1756±202
Серија 2	PCL у CHCl_3 :DMF (1:1)	952±57
Серија 3	PCL у CHCl_3 :DMF (1:3)	943±83
Серија 4	PCL у CHCl_3 :DMF (3:1)	1460±138
Серија 5	PCL:PEG (1:1) у CHCl_3	463±26
Серија 6	PCL:PEG (1:1) у CHCl_3 :DMF (1:1)	612±26
Серија 7	PCL:PEG (1:1) у CHCl_3 :DMF (3:1)	412±27
Серија 8	PCL:PEG (3:1) у CHCl_3 :DMF (1:1)	875±95
Серија 9	PCL:PEG (3:1) у CHCl_3 :DMF (1:3)	458±23
Серија 10	PCL:PEG (3:1) у CHCl_3 :DMF (3:1)	1285±99
Серија 11	PCL:PEG (1:4) у CHCl_3	НП*
Серија 12	PCL:PEG=1:4 у CHCl_3 :DMF=1:1	НП*
Серија 13	PCL у CHCl_3 :DMF=7:3	НП*
Серија 14	PEG у CHCl_3	НП*

*НП – није погодно за производњу скефолда. Серија 11 (у опсегу концентрација од 17 до 27%) дала је влакна, која су била превише танка са веома малом густином; Серија 12 (у опсегу концентрација од 17 до 27%) резултирала је сувише вискозним полимерима; Серија 13 (у опсегу концентрација од 17 до 27%) показала је непотпуну хомогеност, стварање фаза; Серија 14 уопште не производи влакна.

Након спроведених детаљних АИ анализа, синтетисане су још 3 додатне серије полимера са циљем екстерне валидације добијених резултата, што је приказано у **Табели 6**. АИ предвиђања су омогућила избор 26 комбинација узорака за креирање нових скефолда путем електроспининга. Након процеса електроспиновања, сви добијени скефолди су детаљно анализирани, чиме је омогућено поређење стварних резултата са предикцијама модела и процена његове поузданости у предвиђању својстава влакана.

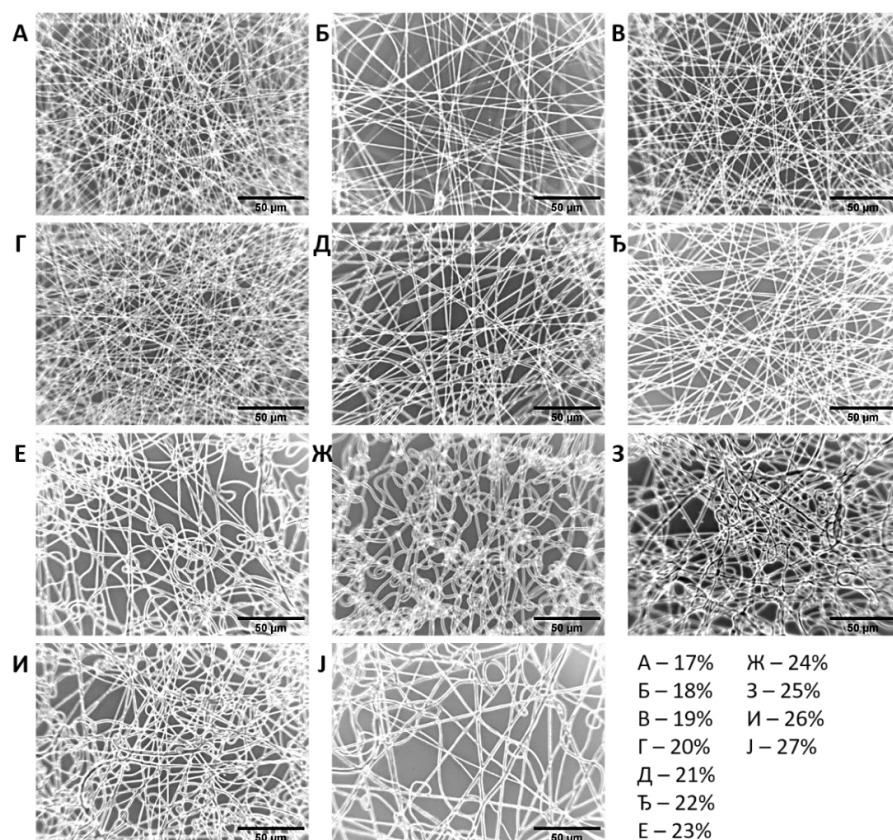
Табела 6. АИ модел екстерне експерименталне валидационе серије полимера

Серија	Хемијска композиција	Дистрибуција пречника нановлакна, nm
Серија 15	PCL:PEG=1:3 у CHCl_3 :DMF=3:1	425±15
Серија 16	PCL:PEG=7:3 у CHCl_3 :DMF=7:3	512±32
Серија 17	PCL:PEG=3:1 у CHCl_3	874±40

4.1.2 Морфолошка карактеризација PCL/PEG влакана

Критеријуми за одабир оптималне формулације скефолда обухватили су више параметара: морфологију влакана што је могуће ближе морфологији природног ванћелијског матрикса, хомогену расподелу влакана на колектору, једноставну припрему полимерних раствора, као и континуирано извођење процеса електроспининга. На основу предикције модела вештачке интелигенције и резултата добијених кроз опсежна експериментална испитивања, најперспективнији формулација

је представљала раствор концентрације од 22% PCL/PEG у односу 7:3, уз коришћење CHCl_3/DMF растварача у односу 7:3. Овај избор је био резултат свеобухватног експерименталног рада и накнадне оптимизације вођене вештачком интелигенцијом. Морфолошке карактеристике добијених влакана за изабрану комбинацију су представљене на **Слици 24**.



Слика 24. Микрографије влакана добијене са оптичког микроскопа за сваку појединачну концентрацију **серије 16** у опсегу 17-27%. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ђ) 22% Е) 23% Ж) 24% И) 25% Ј) 26% раствор Ј) 27%.

Као што се може видети, опсег концентрација за коришћену комбинацију је у распону од 17% до 27%. Концентрација раствора има значајан утицај на коначну морфолошку структуру и расподелу влакана. (233) Поред тога, површински напон и вискозитет раствора играју кључну улогу у одређивању концентрационог опсега у којем је могуће добијање континуираних влакана правилне геометрије током електроспиновања. Када је вискозност раствора ниска, површински напон постаје доминантан фактор који утиче на морфологију влакана, а испод одређене концентрације уместо влакана формирају се капљице. Испитивани опсег концентрација од 17-27% изабран је путем експерименталних истраживања, па раствори испод 17% нису поседовали оптималан вискозитет, стога формирање влакана је било немогуће.

Како се концентрација раствора полимера повећава, тако расте и вискозност раствора, што директно утиче на формирање влакана. На **Слици 24** (17-20%) са нижим концентрацијама могу се уочити танка и насумично распоређена влакна, где постоји присуство перлица, капљица и нехомогености. Због неадекватне вискозности раствора,

односно недовољне за процес електроспининга, долази до стварања капи при чему се млаз не распршује, па се због тога у морфологији влакана јављају дефекти. Објашњење за ниске концентрације раствора полимера које онемогућују стварање влакана, лежи у томе да раствор нема довољну растегљивост, што доводи до формирања капљичастих структура (перли) дуж влакана. Са повећањем концентрације раствора присуство перлица се постепено смањује. (56,234)

Са друге стране, концентрације раствора полимера изнад 27%, онемогућиле су добијање влакана због слабе контроле протока раствора и високог вискозитета раствора, као и због кохезивне природе вискозних раствора. Висок вискозитет значајно отежава проток раствора кроз иглу шприца, што доводи до нестабилног формирања истегљивог млаза, и онемогућава формирање влакана. (33) Многе студије су доказале повезаност концентрације раствора полимера, односно вискозности са морфолошком структуром. (235), (236) На основу анализе микрографија (**Слика 24**) може се закључити да повећање концентрације раствора полимера значајно утиче на морфологију влакана. При нижим концентрацијама формирају се дисконтинуална влакна са дефектима, док оптималне и незначајно, али веће концентрације резултирају уједначеним и глатким влакнима повећаног пречника и смањене порозности. Најоптималнији опсег за добијање влакана са уједначеним пречником и континуираним током формирања износи између 20 и 22%. У том интервалу, процес електроспиновања се одвија стабилно, што резултује хомогеном морфологијом влакана. Превисоке концентрације (23-27%) често доводе до појаве морфолошких неправилности и промене у типу влакана, што је последица отежаног растезања млаза током процеса електроспиновања.

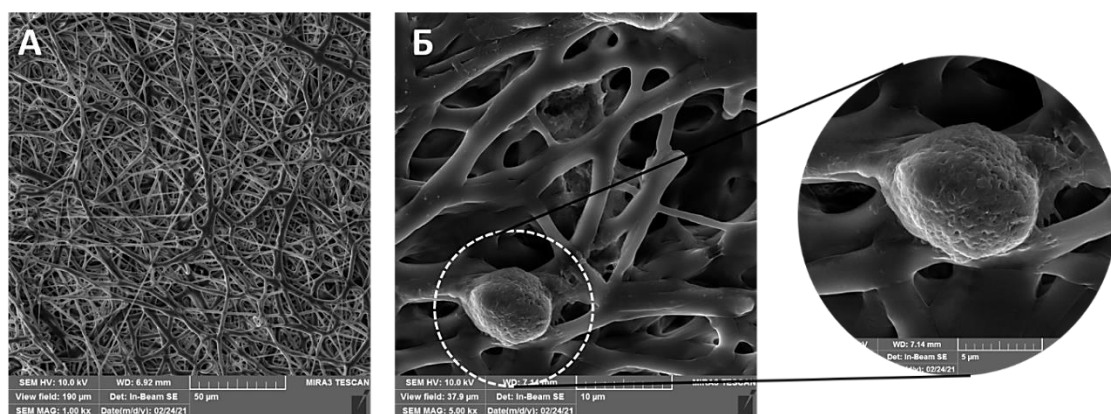
У **Табели 7** су приказане вредности пречника влакана у зависности од концентрације полимерног раствора.

Табела 7. Концентрације раствора полимера и пречник резултујућих влакана

Концентрација раствора	Пречник (nm)
17%	412
18%	524
19%	488
20%	575
21%	467
22%	473
23%	666
24%	446
25%	540
26%	420
27%	474

На основу вредности из **Табеле 7** није уочена јасна зависност пречника влакана од концентрације раствора. (62) У таквим случајевима узрок може бити константна вредност параметара процеса и средине, која не доводи до драстичних измена у морфологији, нарочито у пречницима влакана. Међутим, узорак са 22% концентрацијом даје најоптималнију морфологију и вредност пречника ($\bar{d} = 473$ nm). Танка и равномерно распоређена влакна, са добро организованом структуром представљају погодну основу за засејавање ћелија и испитивање њихове биокompatibilности.

Микрографије одабраног скефолда са засејаним ADMSC ћелијама су приказане на **Слици 25**. Циљ је био да се докаже биокompatibilност синтетичких влакана и матичних ћелија. Умрежена, порозна, тродимензионална структура влакана омогућава адекватну подршку адхезији и потенцијалан раст ћелија. Ови резултати указују на успешну интеракцију матичних ћелија са PCL/PEG електроспинованим влакнима.

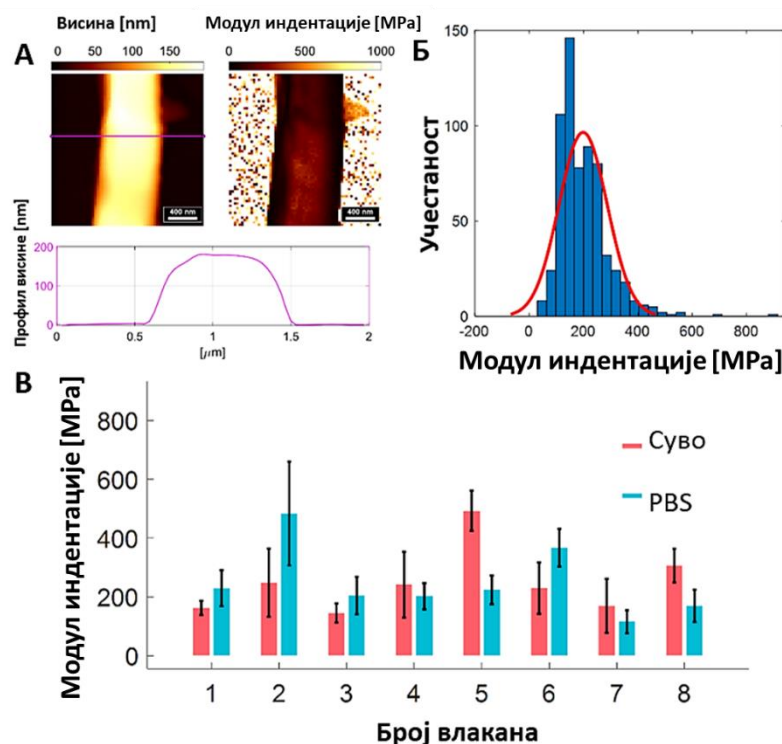


Слика 25. SEM слике влакана **серије 16:** PCL/PEG (7:3) у CHCl_3/DMF (7:3). А) Скефолд без ћелија (увећање 1000 кх) Б) Скефолд засејан ADMSC ћелијама (увећање 5.000 кх), и увећана ADMSC ћелија (увећање од 10.000 кх).

4.1.3 Механичка својства и биокompatibilност влакана

Материјали који се користе у ткивном инжењерингу морају испуњавати високе стандарде биомеханичке отпорности и еластичности, посебно када су предвиђени за имплантацију у зглобове или кости. Међутим, област примене намењене површинским слојевима коже у овом истраживању, захтева значајну механичку отпорност материјала како би сачували интегритет током трајања третмана, које може износити од неколико дана до 10 недеља.

Испитивање механичких особина, односно модула индентације синтетисаних влакана је извршено помоћу AFM методе (Слика 26). Резултати су показали да се модули индентације влакана крећу у распону од 115 до 483 МПа, са средњом вредношћу од 198.4 ± 88.7 МПа, што указује на широку дистрибуцију и значајну варијабилност у механичким својствима влакана. Такође је битно нагласити да влакна не показују значајне варијације својстава између сувог и хидратисаног стања, што је реткост код већине биолошких материјала. Средња вредност модула индентације у сувом стању је износила 200.4 ± 90.5 МПа, док је у PBS раствору била 197.2 ± 87.7 МПа, што указује на скоро идентичну вредност у оба стања. Ово је у супротности са понашањем већине биолошких материјала, попут колагена, који у хидратисаном стању постаје знатно мекши у поређењу са сувим. (237) Међутим, синтетички полимерни материјали, у складу са својом хемијском природом, не могу показивати исте карактеристике као и природни. Хемијска природа PCL/PEG синтетичких скефолда је хидрофобна, самим тим је немогуће очекивати другачије понашање у воденој средини у току краткорочног потапања (у PBS раствору), чиме се и објашњавају сличне вредности добијене у сувом и хидратисаном стању.



Слика 26. Приказ мерења индентације појединачних влакана: А) Мапе висине и модула индентације као и профил попречног пресека примерног влакна. Б) Обједињени модули индентације, добијени из свих изабраних сила-кривих за сва влакна, приказани као дистрибуција прилагођена Гаусовој функцији у сувим и

хидратисаним условима. Средња вредност износи 198.4 ± 88.7 МПа. В) Поређење индивидуалних вредности модула индентације појединачних у сувим и хидратисаним условима. Сва мерења су спроведена на узорцима са 22% PCL/PEG (70:30) у CHCl_3/DMF (70:30).

Према литературним подацима, модул индентације коже се креће у распону од 5 до 100 МПа, у зависности од методологије мерења (238), (239) У овом истраживању, средњи модул индентације електроспинованих PCL/PEG влакна је износио 200.4 ± 90.5 МПа у сувом стању и 197.2 ± 87.7 МПа у хидратисаном стању, што је приближно двоструко више од вредности модула индентације за кожу измерених AFM методом. (240)

Резултати добијени за PCL/PEG влакна могу се упоредити са вредностима из литературе за појединачне полимере. Према резултатима претходних истраживања, модул индентације електроспинованих PCL влакана варира од 600 МПа до чак 1.9 GPa (241), док се за PEG влакна овај параметар креће у распону од 100 МПа до 1000 МПа. (242) Присуство PEG-а, који има значајно ниже вредности модула у поређењу са влакнима PCL полимера, доводи до укупног смањења крутости насталих влакана. Модул индентације код синтетичких полимерних влакана је виши од модула индентације комбинованих или природних полимерних влакана. Према раније објављеним студијама измерени модул индентације за електроспинована PVA влакна је износио 2.1 GPa, док за најлон-6,6 од 453 МПа до 950 МПа у зависности од употребљене брзине протока током процеса електроспиновања. (243), (244) Вредности модула индентације за синтетичке врсте влакана су веће неколико пута од природних или комбинованих влакана. Међутим, комбинацијом синтетичких и природних полимера могуће је утицати на смањење крутости влакана. То се види на примеру електроспинованих влакана фиброина и PCL, која су показала модул индентације од 159 ± 10.8 МПа. (245) Иако су у нашем истраживању коришћена оба полимера синтетичког порекла, утицај PEG полимера на механичка својства је сличан утицају природних полимера, с обзиром на његову већу флексибилност и мању крутост у односу на PCL.

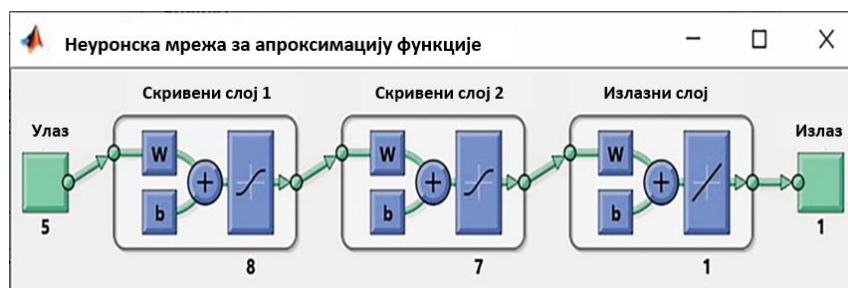
Поређењем добијених вредности са литературним подацима утврђено је да PCL/PEG влакна имају већи модул индентације у односу на људску кожу, што је и очекивано с обзиром на синтетичко порекло материјала. Међутим, у поређењу са чистим PCL влакнима, вредности модула индентације су нешто ниже, што потврђује да присуство PEG полимера доприноси бољој прилагодљивости материјала.

Овакав баланс између механичке стабилности и еластичности добијен је пажљивим одабиром и комбиновањем полимера различитих физичких својстава. Механичка својства ових скефолда доприносе адекватној ћелијској адхезији и ефикаснијој имитацији природног ванћелијског матрикса, што је од великог значаја за одвијање убрзаног процеса зарастања рана.

4.1.4 Модел вештачке неуронске мреже (ANN)

Неуронска мрежа је истренирана, валидирана и верификована са скупом података од 81 узорка добијеног из експеримената (70% за обуку, 20% за валидацију и 10% за тестирање). Однос између излазних резултата и појединачних улазних података визуелно је представљен у **Табели 2П у Прилогу**. Подаци у **Табели 2П** представљају структуру улазне датотеке која садржи све вредности потребне за обуку такве неуронске мреже (ова табела је пример структуре улазних података и садржи само 2 реда улазних података; сви подаци из експеримента су коришћени током обуке мреже).

Без примене ANN-а, одређивање оптималне комбинације параметара за постизање жељеног пречника влакана била би значајно сложенија и мање ефикасна. За креирање ANN модела коришћена је MATLAB функција "фитнет", као што је приказано на **Слици 27**.



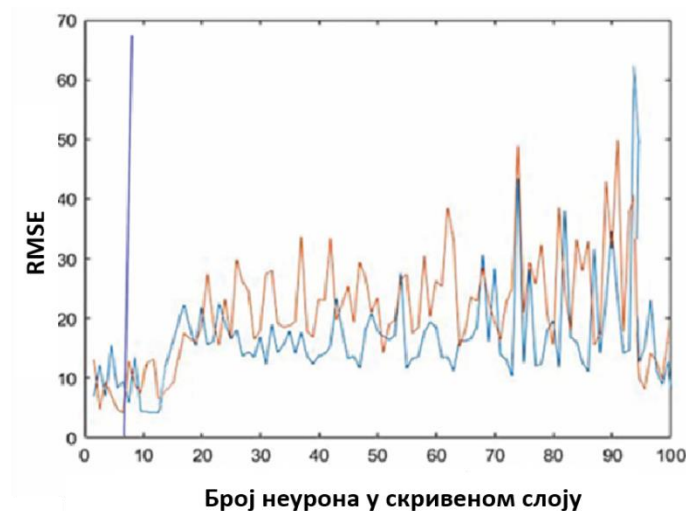
Слика 27. Шематски приказ неуронске мреже

Неуронске мреже функционишу по принципу препознавања образаца и корелација унутар скупа података, имитирајући биолошке принципе кроз рачунарску систем састављен од вештачких неурона. Ови неурони су међусобно повезани коефицијентима, формирајући неуронску структуру. Сваки неурон прима улазне параметре и генерише излазне, стварајући сложену мрежу.

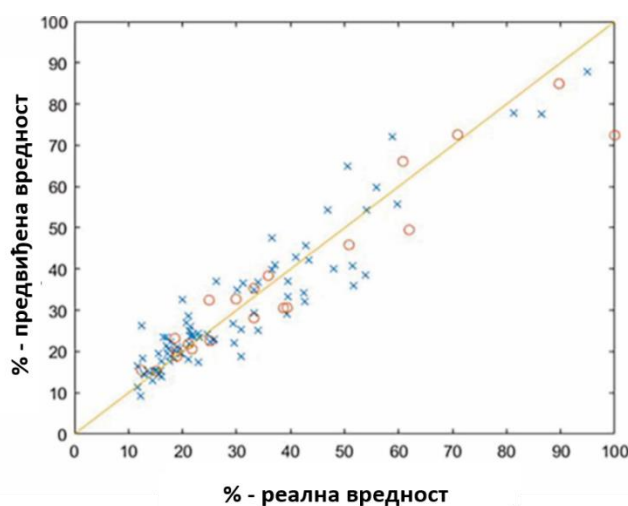
Једна од најчешће коришћених модела је вишеслојна перцептронска неуронска мрежа (енгл. *MLP – Multilayer Perceptron*), која се састоји од улазног, једног или више скривених, и излазног слоја. Током тренинга, односи између улазних и излазних података се успостављају подешавањем везе са алгоритмима стварних и предвиђених вредности.

Међутим, одабир броја неурона у скривеном слоју је кључан. Премало неурона доводи до недовољног прилагођавања, док превише доводи до преоптерећења, чинећи мрежу превише сложену и нетачном.

Да би се одредио одговарајући број неурона у скривеном слоју, извршене су симулације са бројем неурона у скривеном слоју у опсегу од 1 до 100 неурона. Као критеријум за евалуацију је коришћен проценат средње квадратне грешке (енгл. *RMSE – Root Mean Square Error*) за обуку и тестирање. Идеалан број неурона је одређен у тачки пресека кривих RMSE за тренинг и тест скуп, што представља баланс између тачности модела и његове способности генерализације. За овај модел, оптималним се показао број од 8 неурона у скривеном слоју (**Слика 28**). Тачност модела и степена сагласности између предвиђених и стварних вредности приказани су на **Слици 29**. Дијаграм илуструју корелацију, где линија представља идеално савршено предвиђање без грешака, где хоризонтална оса приказује стварне вредности, а ANN пружа предвиђене вредности на вертикалној оси. Постигнута RMSE од приближно 8.7% указује на добар квалитет предикције с обзиром на комплексност улазних параметара.



Слика 28. Графикон RMSE везе између скупа података за обуку (плава линија) и скупа података за валидацију (наранџаста линија) у зависности од броја неурона у скривеном слоју



Слика 29. Графички приказ прецизности ANN модела. Хоризонтална оса представља проценат стварних (експерименталних) резултата, док вертикална оса приказује проценат вредности предвиђених од стране неуронске мреже. Подаци из скупа за обуку су приказани плавим тачкама, док су подаци из скупа за тестирање наранџастим тачкама. Идеална линија (дијагонала) представља савршено поклапање предвиђених и стварних вредности

Екстерна валидација ANN-а

Након што је развијена и верификована тачност ANN модела на делу експерименталних података, следећи корак је подразумевао процену на подацима који нису део оригиналних експерименталних истраживања. За ову сврху су генерисана три додатна скупа улазних параметара, а ANN је коришћен за предвиђање пречника влакана са приближним пречником од 500 nm. Детаљи ових улазних параметара дати су у Табели 8.

Табела 8. Улазни подаци за екстерно тестирање и валидацију ANN мреже

ANN улазни параметри			ANN излазни параметар: Предвиђање пречника влакана [nm]		Експериментално мерење пречника влакана [nm]	PCC [r_{xy}]
Концентрација раствора	Q [ml/h]	U [kV]				
Група 01 – Серија 15						
PCL:PEG=1:3 у CHCl ₃ :DMF=3:1						
17%	1	18	459		417	0.909
18%	1	18	495		458	0.926
19%	1	16	486		438	0.901
20%	1.1	15	472		418	0.885
21%	1	15	492		456	0.926
22%	1	15	421		373	0.885
23%	1	15	429		394	0.917
24%	1	15	411		367	0.893
25%	1	15	553		507	0.917
Група 02 – Серија 16						
PCL:PEG=7:3 у CHCl ₃ :DMF=7:3						
17%	0.5	10	445		412	0.926
18%	0.5	12	561		524	0.935
19%	0.6	11	527		488	0.926
20%	0.6	11	604		575	0.952
21%	0.6	15	504		467	0.926
22%	0.7	15	487		473	0.971
23%	0.7	15	699		666	0.952
24%	1	12	482		446	0.926
25%	1	15	567		540	0.952
26%	1	15	454		420	0.926
27%	1	15	507		474	0.935
Група 03 – Серија 17						
PCL:PEG=3:1 у CHCl ₃						
17%	0.8	14	778		701	0.901
18%	1.1	14	899		810	0.901
19%	1.1	14	1034		923	0.893
20%	1.3	14	1069		946	0.885
21%	1.5	15	1006		923	0.917
22%	1.2	15	1047		943	0.901

Пирсонов коефицијент корелације (енгл. *PCC – Pearson correlation coefficient*) у **Табели 8** је коришћен за успостављање корелације између предвиђених вредности и стварних експерименталних резултата. У статистици, узорак Пирсоновог коефицијента корелације (r_{xy}) квантитативно изражава линеарну везу између два скупа података, процењујући однос њихове коваријансе и производа њихових стандардних девијација. Он нормализује коваријансу, обезбеђујући резултате у опсегу од -1 до 1. Вредност $r = 1$ указује на савршену позитивну корелацију, $r = -1$ на савршену негативну корелацију, а $r = 0$ означава да нема линеарне корелације. Пирсонов коефицијент открива линеарне

корелације између варијабли и не узима у обзир друге типове односа, као што су апсолутне зависности.

Формула за Пирсонов коефицијент корелације је дата следећом једначином:

$$r_{xy} = \frac{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{(S_X S_Y)} \quad (14)$$

Где су:

n – величина узорка

X_i, Y_i – су специфичне тачке за узорке са индексом i

$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$ – средња вредност узорка

$\bar{Y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i$ – средња вредност узорка

$S_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$ стандардна девијација узорка

$S_y = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$ стандардна девијација узорка

4.1.5 Испитивање степена апсорпције и деградације

Биокомпатибилност електроспинованих материјала дефинисана је не само биолошким карактеристикама, већ физичко-хемијским, међу којима су биоразградивост, хидрофилност и способност апсорпције воде.

Тест апсорпције воде у *in vitro* условима је спроведен под контролисаним условима, са циљем процене потенцијала скефолда да апсорбује и задржи течност унутар своје структуре. Резултати су показали значајан капацитет упијања воде, при чему је примећено постепено повећање апсорпције током испитиваног времена. Након 24 сата, скефолди су показали капацитет апсорпције воде од 183% у односу на иницијалну масу скефолда. Ова особина је посебно важна за домен зарастања рана, јер обезбеђује ефикасно управљање ескудатом, смањује ризик од инфекције и одржава влажну средину током процеса зарастања.

Добијени резултати су у складу са резултатима претходно објављених студија, који такође истичу значај степена апсорпције воде, уколико се ради о домену зарастања рана и контролисаном отпуштању терапеутских агенаса из скефолда. (246), (247). Посебно је занимљиво је да иако су влакна синтетичког порекла, и PCL је изразито хидрофобног карактера, резултат степена апсорпције за PCL/PEG влакна је релативно висок. Ова појава се може објаснити присуством PEG-а, који је високо хидрофилни полимер и има способност да апсорбује и задржава воду кроз механизме стварања водоничних веза. (248) Комбинација PCL-а и PEG-а резултира двофазним скефолдом у којем PEG делује као хидрофилна компонента, која доприноси побољшаној апсорпцији воде унутар порозне структуре влакана. PEG се због својих хидрофилних способности широко користи за побољшање интеракције материјала са биолошким системом. Његова

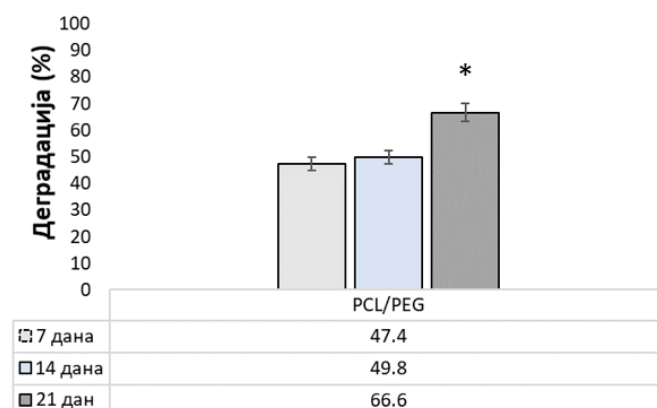
способност да формира водоничне везе са молекулима воде омогућава високу апсорпцију течности, што је већ потврђено у претходним студијама. (249)

Комбинација синтетичких полимера са хидрофилним компонентама у кополимерним системима има значајан утицај на капацитет апсорпције воде. (245) У овом случају, присуство PEG-а у систему не само да побољшава хидрофилност, већ и утиче на морфологију. PEG може довести до стварања мањих и неправилнијих пора унутар структуре влакана, чиме се повећава капиларна апсорпција. Осим тога, процес електроспиновања може довести до специфичне морфологије са високом порозношћу, што додатно олакшава апсорпцију воде. Истраживања су показала да влакна са повећаном порозношћу омогућавају лакше продирање воде и повећан капацитет апсорпције, што је у корелацији са добијеним резултатима. (242) Међутим, прекомерна хидрофилност може довести до брзе деградације и губитка механичке стабилности, док изразито хидрофобна површина омета ћелијску адхезију. (250)

Резултати испитивања апсорпције воде код електроспинованих PCL/PEG влакана показују да увођење PEG-а значајно утиче на хидрофилност и физичко-хемијска својства добијених влакана. Упркос изразитој хидрофобности PCL-а као базног полимера у матрици, присуство PEG-а доводи до појаве повећане способности упијања воде. Битно је истаћи, да је повећана апсорпција воде постигнута без нарушавања структурне стабилности скефолда. Скефолд је задржао своју структуру и форму у воденој средини током експеримента, што је битан фактор за одржавање механичке стабилности приликом контакта са ткивом за потенцијалну *in vivo* примену.

Што се тиче особина биоразградивости, скефолди дизајнирани за примену у ткивном инжењерингу морају испуњавати неколико захтева, укључујући способност контролисане биоразградње. У зависности од домена примене, скефолди могу служити као носачи за контролисано ослобађање лека, привремену биомеханичку подршку ткиву, или као материјали који подстичу ћелијску адхезију, пролиферацију и регенерацију. Битно је нагласити, да избор полимера одговарајућих својстава и оптималне брзине разградње представља један од кључних критеријума за примену скефолда у ткивном инжењерингу.

У оквиру анализе биоразградивости скефолда, праћена је разградња скефолда током периода од 3 недеље (**Слика 30**). Испитивање обухвата процену губитка масе, као и визуелне и структурне промене скефолда током испитиваног времена. Резултати су показали динамику деградације од 47.4% у првој недељи, 49.8% у другој и 66.6% у трећој недељи. Очекује се да ће овакав скефолд, који је био најдетаљније анализиран у овом истраживању, потпуно деградирати у року од 8 до 12 недеља, што је у складу са подацима из литературе (251), уз мања одступања која су последица специфичности састава коришћеног полимера. Утицај хидрофилнијег полимера на темпо разградње, потврђују и литературни подаци. Електроспинована влакна PCL и полиетилен оксида (PEO) се разграђују брже од чистих PCL влакана. Повећање садржаја хидрофилног PEO доводи до брже деградације. (252) Ипак, овакав ефекат прати и смањење механичке стабилности влакана, што указује на потребу оптимизације хемијског састава скефолда.



Слика 30. Тест деградације. Вредности представљају средњу вредност $\pm$ SD за 5 експеримената. * $p < 0.05$ у поређењу са контролом (100%), $p < 0.05$ у поређењу са различитим временским тачкама (недељама).

Наведени резултати указују да је увођење PEG-а у структуру PCL скефолда имало значајан утицај на динамику разградње скефолда, што је посебно уочљиво након 21 дана инкубације, када је забележен статистички значајан пораст процента деградације ($p < 0.05$). Присуство PEG-а вероватно доводи до убрзаног процеса разградње, због поседовања хидрофилних особина, које омогућавају лакше продирање воде и убрзану хидролизу естраских веза унутар полимерног скефолда. Осим тога, присуство PEG-а доводи до смањења кристалности PCL-а, што је у складу са литературним подацима, који показују да додавање PEG-а у PCL матрицу повећава стопу хидролизе и омекшава структуру материјала, чиме се смањује његова механичка стабилност током времена. (253) Истраживања су показала да PCL у чистом облику може имати много дужи временски период разградње, док додавање PEG-а омогућава контролисану деградацију, што је посебно важно за биомедицинске примене. Правилним дефинисањем оптималног односа хидрофобних и хидрофилних полимера, може бити постигнута оптимална комбинација полимерних компоненти у матрици са циљем добијања одговарајућих механичких и деградабилних својстава материјала.

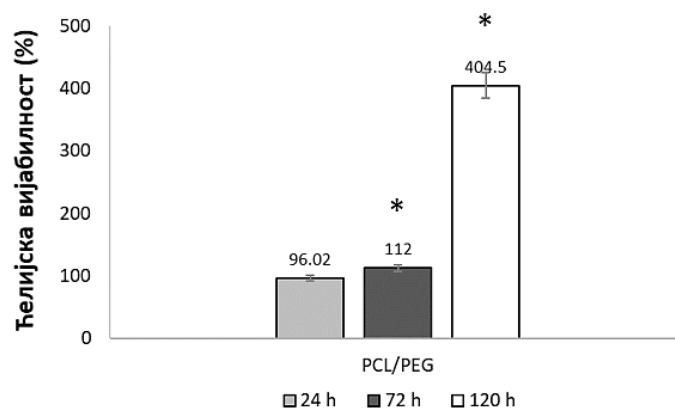
Усклађеност добијених резултата са литературним подацима сличних истраживања, додатно потврђује својства синтетичких полимерних влакана (84), и јасно указује на потенцијал добијеног материјала за примену у третману зарастања рана.

4.1.6 Испитивање цитотоксичности и вијабилности

Поред одговарајућих механичких карактеристика, један од кључних захтева за материјале намењене примени у биомедицинском пољу, посебно у ткивном инжењерингу, јесте њихова биокompatibilност. (254) *In vitro* анализа цитотоксичности пружа кључне податке о биокompatibilности синтетисаног скефолда, што је од значаја за његову потенцијалну примену у третману зарастања рана.

У овом истраживању за процену цитотоксичности синтетисаног PCL/PEG скефолда коришћене су здраве ћелије фибробласта (MRC-5), чија је вијабилност праћена током 120 сати применом стандардизованог МТТ теста. Резултати испитивања цитотоксичности, приказани на **Слици 31**, указују на висок степен компатибилности и нетоксичност не само PCL/PEG скефолда, већ и његових производа разградње. Након 24 сата, вијабилност ћелија је износила 96.02% у поређењу са контролном групом, без статистички значајне разлике ($p < 0.05$), што указује на одсуство токсичних ефеката.

Након 72 сата, забележена је пролиферација ћелија са вијабилношћу од 112% у односу на контролу, док је након 120 сати пролиферација била изузетно изражена, и достигла 404.5%. Овакви резултати указују на стимулативни ефекат скефолда на пролиферацију ћелија током продужене инкубације. Добијени резултати потврђују одсуство цитотоксичности испитиваног скефолда, и осим тога указују на потенцијал у подстицању ћелијског раста током испитиваног периода.



Слика 31. Вијабилност MRC-5 ћелија након третмана са PCL/PEG скефолдом током 120 сати. * $p < 0.05$ у поређењу са контролом (100%).

Важно је нагласити, да досадашња истраживања на чистим PCL влакнима су показала значајно ограничену адхезију и пролиферацију ћелија, где је вијабилност износила 75–85% у првих неколико дана. (255) Такав резултат се може приписати хидрофобној природи, као и крутости PCL-а, што на неки начин спречава ћелијску интеракцију са скефолдом. Недостатак хидрофилних група у полимеру ограничава способност везивања воде, и самим тиме погоршава услове за раст ћелија.

Са друге стране, у овом истраживању, комбинација PCL-а са PEG-ом доводи до значајног побољшања ћелијске вијабилности. Полимер PEG је хидрофилне природе, и омогућава бољу апсорпцију воде, чиме се неометано врши лакши транспорт хранљивих материја и кисеоника до ћелија, што резултира повећаном вијабилношћу ћелија. Истовремено, PEG смањује укупну крутост скефолда, и самим тиме олакшава ћелијску комуникацију унутар полимерне структуре. Слични закључци су такође добијени у другим студијама. У истраживању где су примењена PCL/PLGA нановлакна, где је коришћена комбинација хидрофобног PCL полимера и хидрофилног PLGA, вијабилност ћелија фибробласта је достигала 300% након 5. дана инкубације, што је упоредиво са резултатима у нашем истраживању. (256) У другој студији, детаљнија анализа PCL/PEG/куркумин скефолда је показала резултате вијабилности 150% након 5. дана инкубације на C2C12 ћелијској линији. (257) Ово може указивати на то да активни агенс – куркумин, додатно стимулише ћелијски раст. У другој сличној студији, PCL/PLA влакна су показали повољан утицај на ћелијску адхезију и метаболичку активност фибробласта без значајног инхибиторног ефекта на пролиферацију током 72 сата. (258)

Комбинација хидрофобних и хидрофилних полимера све чешће се користи у ткивном инжењерингу јер омогућава добијање материјала са унапређеним својствима. У овом истраживању, додавање PEG-а у PCL скефолд је пружио неколико бенефита. Пре свега, значајно је повећана хидрофилност и флексибилност материјала, али истовремено је запажен утицај на морфологију влакана, где је дошло до стварања већих

пора унутар структуре скефолда. Поре унутар PCL/PEG скефолда олакшавају размену гасова и хранљивих материја, што је битно за дугорочно одржавање ћелијске вијабилности.

Добијени резултати показују да PCL/PEG нановлакна подстичу знатно интензивнији раст ћелија у поређењу са чистим PCL влакнима, али и у односу на друге синтетичке материјале који су до сада испитивани. Позитиван ефекат овако синтетисаног скефолда је највероватније резултат уравнотежених физичких и хемијских својстава – хидрофилност, порозност, и механичка прилагодљивост овог скефолда омогућавају ћелијама да се лакше вежу, опстану и пролиферишу на испитиваном материјалу. PCL/PEG нановлакна показују добру компатибилност, високу ћелијску вијабилност и подстичу пролиферацију ћелија током испитиваног времена. У поређењу са литературним подацима, добијени резултати указују на значајну предност PCL/PEG матрице у односу на чисти PCL скефолд или скефолде искључиво хидрофобног састава.

4.1.7 Анализа антибактеријске активности

У циљу побољшања антимикробних својстава материјала намењених за *in vivo* примену, инкорпорација антибиотских агенаса у структуру скефолда представља један од кључних циљева у области савременог биомедицинског инжењерства. (259) Инфекције на месту ране могу значајно успорити процесе регенерације ткива, што је нарочито изражено у случају присуства биофилма, који бактерије стварају да би се заштитиле од антибиотске терапије. Стога је од пресудног значаја да биоматеријал буде биокомпатибилан, а и да покаже одређени степен антимикробне активности.

Антимикробна својства PCL/PEG скефолда су побољшана путем инкорпорације антибиотика ципрофлоксацина и гентамицина, који се користе у терапији инфекција коже и меких ткива. Избор ових антибиотика базиран је на њиховом широком спектру деловања и клиничкој примени у лечењу инфекција узрокованих како грам-позитивним тако и грам-негативним патогенима. (260) Антибиотски агенси су додати у раствор полимера пре процеса електроспиновања, што је омогућило равномерну дистрибуцију активних супстанци унутар добијених влакана.

Антимикробна својства припремљених скефолда анализирана су тестом дифузије на агару, где су испитани ефекти инкорпорираних антибиотика против различитих бактеријских сојева, укључујући *S. aureus* 25923, *S. aureus* MRSA 43300 и мултирезистентни изолат *P. aeruginosa* BR5H. Добијени скефолди показали су снажан инхибиторни ефекат на раст већине тестираних бактеријских сојева, изузев мултирезистентног изолата *P. aeruginosa* BR5H (Табела 9). Гентамицин је показао ефекат против осетљивих сојева, док је ципрофлоксацин био изразито ефикасан против грам-негативне *P. aeruginosa*, у складу са његовим познатим механизмом деловања кроз инхибицију ДНК гиразе. (261) Насупрот томе, његов ефекат против грам-позитивног соја *S. aureus* био је нешто слабији, што је очекивано с обзиром на антибактеријски профил ципрофлоксацина.

Табела 9. Пречник зоне раста инхибиције

Тип патогена	PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин (mm)	PCL/PEG /0.1 % гентамицин (mm)	PCL/PEG
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	35 x 36 (14)*	20 x 20 (13)	-
<i>P. aeruginosa</i> BR5H	- (14)	- (14)	-
<i>S. aureus</i> 25923	30 x 30 (13.5)	21 x 21 (14)	-

<i>S. aureus</i> MRSA 43300	30 x 30 (14)	20 x 20 (13.5)	-
--------------------------------	--------------	----------------	---

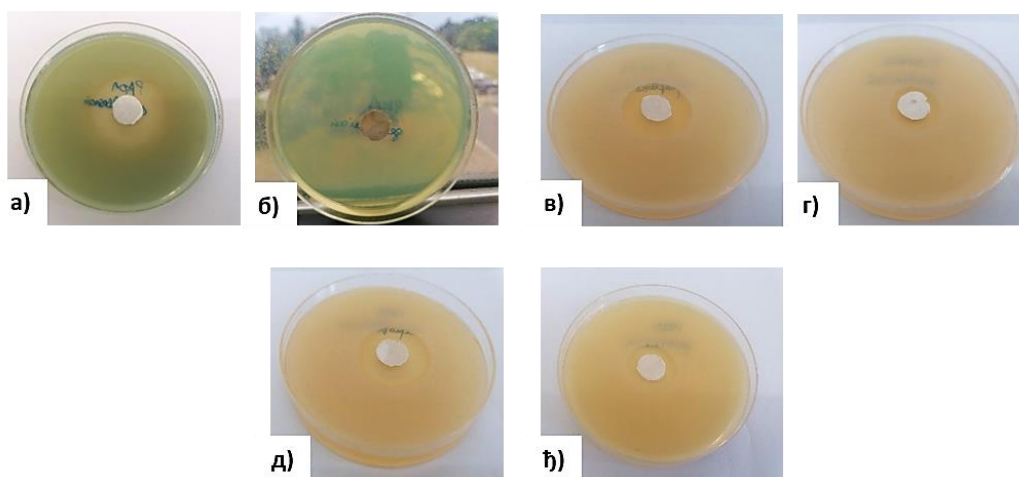
*у загради је дат пречник самог диска

На **Слици 32** приказани су визуелни резултати теста осетљивости бактерија на скефолде спроведеног методом диск-дифузије. Антимикробни ефекат скефолда са ципрофлоксацином је посебно изражен, што указује на његов потенцијал у спречавању бактеријских инфекција. Са друге стране, скефолди са гентамицином су показали изражену антимикробну активност против *S. aureus*, што је у складу са механизмом деловања гентамицина који спада у аминогликозидне антибиотике, који инхибирају синтезу протеина у бактеријама. (262), (263) Међутим, као што је било очекивано, оба антибиотика су показала ограничену ефикасност против мултирезистентног изолата *P. aeruginosa* BR5H, што је у складу са претходним истраживањима, која су показала да одређени сојеви *P. aeruginosa* могу развити висок ниво резистенције на флуороквинолоне и аминогликозиде због активације механизма одбацивања антибиотика и модификације одређених ензима. (264) Ефикасност ципрофлоксацина се показала у сузбијању грам-негативних патогена, док је гентамицин показао снажан ефекат против грам-позитивних бактерија, што говори да би вероватно комбинација ова два антибиотика могла обезбедити бољу антимикробну заштиту уколико се скефолд примењује у третману зарастања рана.

Што се тиче резултата из других научних студија, синтетисана влакна PCL/целулоза такође нису показала ефекат на испитиване сојеве бактерија и гљивица. Међутим, додавањем различитих концентрација цирконијум-диоксида (ZrO_2), дошло је до појаве значајних антимикробних ефеката, што потврђује да сама полимерна структура без активног агенса често није довољна за постизање антимикробне ефикасности. (265)

Слични закључци су изведени и у другом истраживању, где су испитивана електроспинована влакна PCL/PVP са и без инкорпорисаних наночестица сребра (AgNPs). Резултати су показали да је антимикробни ефекат на *E. coli* and *S. Aureus* био само присутан код третмана нановлакна са инкорпорисаним AgNPs, док полимерни скефолд PCL/PVP без честица нису испољавала антибактеријски ефекат. (266)

Битно је истаћи, да синтетисани скефолди играју кључну улогу као носачи активних агенса унутар своје матрице. Успешно и контролисано ослобађање активних молекула из структуре матрице говори о ефикасној инкорпорацији и оптималној структури влакана. Способност скефолда да одржи контролисано ослобађање инкорпорираних супстанци током времена додатно истиче важност структурног скелета синтетисаног скефолда.



Слика 32. Утицај третмана PCL/PEG скефолда на а) *P. aeruginosa* PAO1 - PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин б) *P. aeruginosa* PAO1 - PCL/PEG/0.1% гентамицин в) *S. aureus* 25923 - PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин г) *S. aureus* 25923 - PCL/PEG/0.1% гентамицин д) *S. aureus* MRSA 43300 - PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин ђ) *S. aureus* MRSA 43300 - PCL/PEG/0.1% гентамицин.

4.1.8 Зарастање рана у *in vitro* условима (скреч есеј)

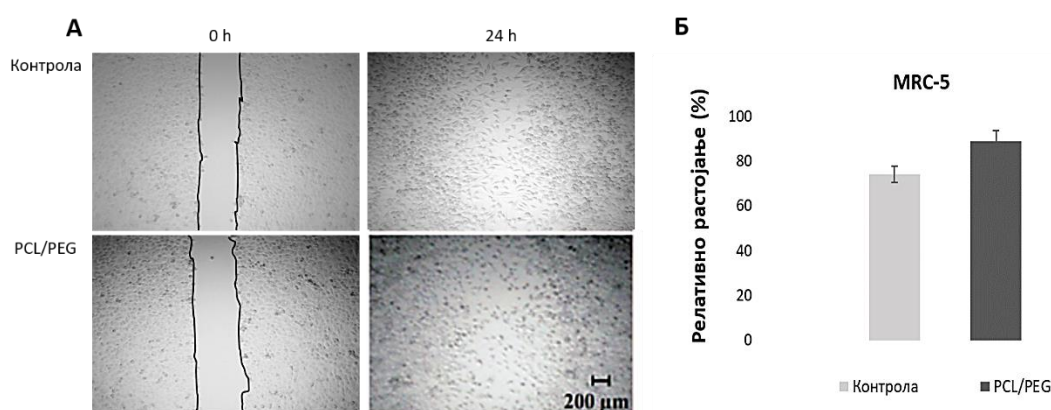
Тест зарастања рана у *in vitro* условима омогућава испитивање потенцијала PCL/PEG скефолда у подстицању миграције ћелија ка вештачки направљеној пукотини, која имитира процес зарастања рана. Добијени резултати теста су приказани на **Слици 32**, и илуструју побољшану миграцију MRC-5 ћелија након третмана са скефолдом. У поређењу са контролном групом, ћелије након PCL/PEG третмана показале су бржу стопу миграције, односно попуњавање пукотине. Након 24 сата, конфлуенција ћелија које су мигрирале у направљено подручје без ћелија, достигла је 89% након третмана, док је у контролној групи износила 74%. Слично као и у тесту за цитотоксичност, присуство PEG компоненте у скефолду побољшава хидрофилност и биодоступност, што омогућава бољу интеракцију са ћелијама и подстиче њихову миграцију. Занимљиво је да кад су у питању синтетички скефолди, комбинација хидрофобних и хидрофилних полимера значајно утиче на резултате биолошких испитивања, што се примећује у овом истраживању, а и у раније објављеним студијама.

Према подацима из литературе, матрице карбон/PVA влакана са куркумином су показале резултате од 92-98% миграције. (267) Као што се може видети, комбинација хидрофобних карбонских и хидрофилних PVA влакана, односно полимера, доприноси бољим физичко-хемијским карактеристикама скефолда у биолошкој средини. У другој студији, комбинација природног и синтетичког полимера желатин/PCL показује 87.74% миграције ћелија након 24 сата. (268) Посебно истакнути ефекат на зарастање рана имају комбинације искључиво природних полимера PVA/HA/CNCs/L-аргинин од 95% зарастања пукотине након 24 сата. (269) Присуство природних или хидрофилних компоненти у синтетисаној матрици полимера, утиче на свеукупне карактеристике материјала, укључујући биолошке процесе унутар самог материјала када се скефолд налази у физиолошкој средини. Афинитет хидрофилних компоненти ка апсорпцији воде омогућује боље окружење за ћелије и транспорт корисних материја. Јако је битно истаћи, да студије наводе да пречник влакана такође игра велику улогу у миграцији ћелија. (270)

Влакна мањег пречника су стимулисала бржу миграцију и већу фософрилацију, што указује на активније интеракције ћелија са подлогом.

Узимајући у обзир наведене резултате и податке из литературе, процес синтезе синтетичких влакана намењених биомедицинској примени мора бити пажљиво осмишљен, узимајући у обзир физичко-хемијске и биолошке карактеристике одабраних полимера. Спроведени тест цитотоксичности који је трајао 120 сати је био довољан да покаже цитокомпатибилност и нетоксичност материјала на миграцију и пролиферацију ћелија. Поред тога, за убудуће, у циљу свеобухватније процене биолошких особина и механизма деловања, будућа истраживања би требало да обухвате тест зарастања рана са фокусом на дугорочније ефекте.

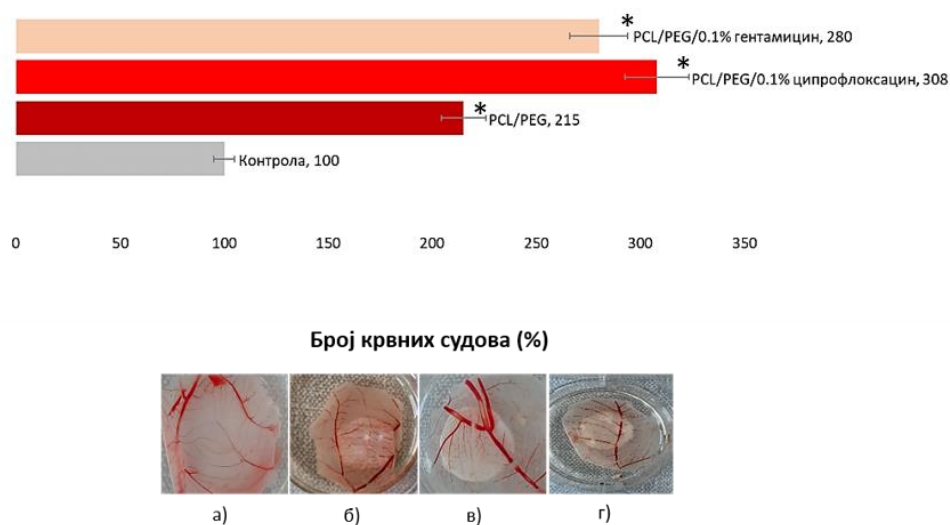
Слика 33 пружа визуелни приказ миграције ћелија и конfluenceције након третмана са PCL/PEG скефолдом.



Слика 33. *In vitro* ефекат PCL/PEG скефолда на миграцију фибробласта. (А) Празно подручје без MRC-5 ћелија без третмана (без скефолда) – скала 200 μm; (Б) Графички приказ резултата након анализе релативне пукотине израчунате са Сlike 33А.

4.1.9 *In vivo* тест хориоалантоичне мембране пилећег ембриона (CAM)

Током развоја фетуса у птичјем јајету, мезодермални слојеви алантоиса и хориона спајају се у хориоалантоичну мембрану (енгл. *CAM* – *Chorioallantoic membrane*). Ова структура се брзо формира и прожета је густом мрежом крвних судова, неопходних за „дисање“ фетуса. CAM се показао као изузетан *in vivo* модел систем за различите типове истраживања, укључујући имплантацију вештачких материјала, развој 3D модела тумора, проучавање процеса ангиогенезе, и многе друге процесе. (271) Представљени резултати на **Слици 34** приказују утицај примењених скефолда на процес неоангиогенезе.



Слика 34. Средње вредности броја формираних крвних судова у оквиру експерименталних група: а) Контрола б) PCL/PEG в) PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацин г) PCL/PEG/0.1% гентамицин скефолди. * $p < 0.05$ у поређењу са контролом (100%)

Контролни PCL/PEG скефолд без антибиотика показао је значајни проангиогени потенцијал, што се огледало у 2.3 пута већем формирању крвних судова у поређењу са негативном контролом (без скефолда). Такав резултат указује да сама структура скефолда, као и својства примењених полимера, могу играти кључну улогу у подстицању процеса неоангиогенезе. Занимљиво је да скефолди који су садржали антибиотике ципрофлоксацин или гентамицин изазвали су још бржи процес неоангиогенезе, са 3.2 пута и 2.8 пута већим бројем крвних судова. Највећа васкуларизација је примећена у групама са додатком антибиотика, при чему је скефолд са ципрофлоксацином показао најизраженији ефекат (**Слика 34**). Процес адекватне васкуларизације је један од кључних параметара за процену биокompatibilности и потенцијала материјала у регенеративној медицини, јер је формирање нових крвних судова је од пресудног значаја за преживљавање и функционалност имплантираних биоматеријала. (272), (273)

Добијени резултати потврђују да скефолди на бази PCL/PEG, чак и без додатих антибиотика, имају потенцијал да подрже васкуларизацију. Присуство PEG полимера у саставу нановлакна повећава хидрофилност, и на тај начин обезбеђује боље услове за опстанак ендотелних ћелија које иницирају неоангиогенезу због олакшане дифузије хранљивих материја. Ово директно утиче на вијабилност и пролиферацију ендотелних ћелија, које су кључне за иницирање и развој процеса неоангиогенезе. (24)

Међутим, бројне студије указују да сама структура полимерног скефолда тражи присуство активних агенаса унутар скефолда. На пример, у једној студији је упоређивано дејство чистог PCL скефолда и PCL са импрегнираним биолошки активним молекулима издвојеним из плаценте (енгл. *sPEM* – *Soluble Placental Extract Molecules*). Ови молекули садрже различите факторе раста и цитокине са доказаним регулаторним и терапеутским ефектима, укључујући потенцијал за утицај на регенерацију ткива, имунолошки одговор и процес неоангиогенезе. Резултати су показали да је чисти PCL у САМ тесту индуковао ангиогени ефекат (11 ± 3 новоформираних крвних судова), док је број крвних судова код PCL-sPEM био знатно већи (31 ± 3), што указује на троструко

појачан ангиогени ефекат. (274) Уочљиво је да PCL скефолд поседује слабији ангиогени ефекат за разлику од PCL-sPEM скефолда импрегнираног биолошки активним молекулима, где стварање нових крвних судова је било скоро 3 пута веће него у случају са чистим PCL скефолдом.

Слични резултати су добијени у истраживању, где су коришћене ендотелне ћелије хуманог порекла култивисане на влакнима PCL/PU. Ова студија је показала високу експресију PECAM-1 и ICAM-1 гена, који су одговорни за међућелијску адхезију, стимулацију имуног одговора и васкуларну индукцију. (275) Поред тога, све је више доказа да додатак природних полимера може унапредити ангиогени потенцијал вештачких влакана. На пример, истраживање које су спровели Lara L. Reys и сар., је показало да влакна од чистог PCL-а имају ограничен утицај на стимулацију ангиогеног одговора, док је додатак фукоидана, сулфатисаног полисахарида, довео је до значајног повећања новоформираних судова. (276)

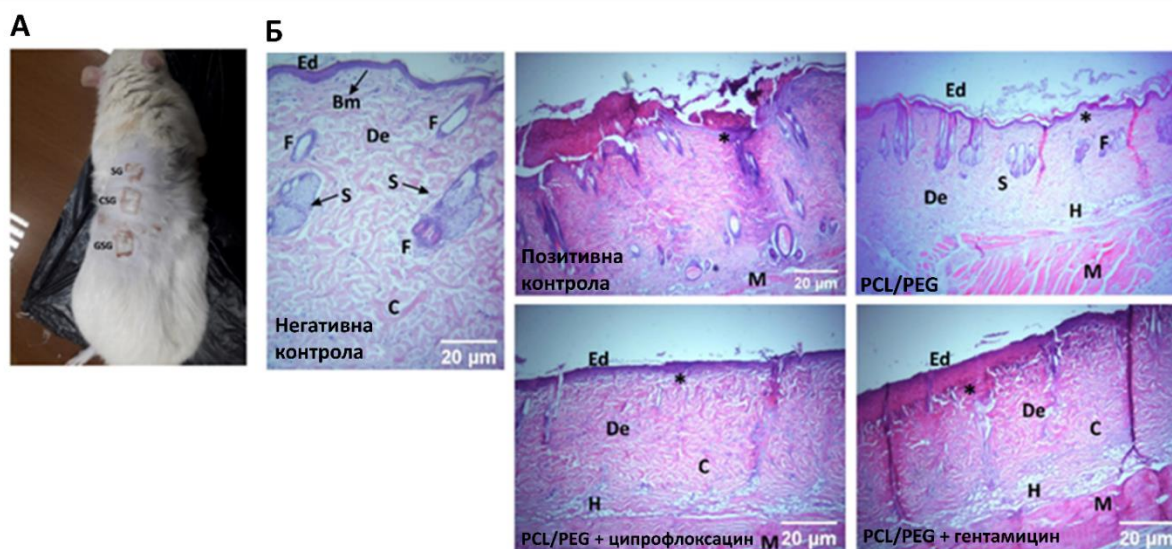
У случају резултата PCL/PEG скефолда, присуство хидрофилног полимера који пружа боље услове за стварање крвних судова, као и додатак антибиотика су одговорни за неометано и повећано стварање крвних судова. Скефолди са импрегнираним антибиотикима су додатно побољшали ефекат неоангиогенезе, спречавајући настајање инфекција и отежано стварање судова. PCL/PEG влакна показују значајну биолошку активност у подстицању неоангиогенезе, а додатак антибиотика додатно појачава овај ефекат. Осим тога, важно је истакнути да морфолошка и геометријска структура нановлакна такође игра улогу у процесу неоангиогенезе. Адекватан распоред пора, пречник влакана, геометријска расподела самих влакана у простору свеукупно утичу на развој и неометан процеса раста крвних судова. Синтетисани скефолд PCL/PEG, као и скефолди са додатим антибиотским агенсима су показали изузетан потенцијал за индукцију нових крвних судова.

4.1.10 Зарастање рана у *in vivo* условима

Процес зарастања рана представља сложен биолошки одговор на оштећење ткива, који се одвија у више фаза: коагулација и хемостаза, инфламаторна реакција, пролиферација и ремоделирање. (277) У циљу процене ефекта електроспинованих PCL/PEG скефолда са антибиотикима на процес зарастања рана, спроведена је *in vivo* студија на мужјацима Wistar albino пацова. Микроскопска анализа (**Слика 35Б**) приказује резултате патохистолошких налаза рана након третмана са тестираним скефолдима.

Анализом узорака добијених седмог дана након третмана, уочене су значајне разлике у морфологији и структури ткива између контролне групе и групе третираних скефолдима. Хистопатолошка анализа обухватила је анализу здраве, опечене и третиране коже, обојених хематоксилином и еозином (H&E). Резултати хистолошке анализе здраве коже показали су очуване структуре епидермиса, дермиса и хиподермиса, са интактним слојевитим сквамозним епителом, нормалним распоредом колагених и еластичних влакана у дермису, као и очуваним фоликулима длаке и жлездама (негативна контрола) (**Слика 35Б**). Насупрот томе, опечена кожа показала је значајна оштећења, укључујући некрозу епидермиса, инфламаторну реакцију и поремећену организацију колагених влакана, као и поремећену васкуларизацију са проширеним крвним судовима (позитивна контрола). Резултати након седмог дана третмана показују да се јављају значајни знаци регенерације у групама третираним синтетисаним скефолдима. У групи третираној PCL/PEG скефолдом без антибиотика, примећена је потпуна реепителизација оштећеног епидермиса. Ипак, резултати су били

знатно бољи у групи третираној скефолдом са антибиотикима, посебно цiproфлoксацином. Ова група је показала изузетно побољшано зарастање, уз смањење инфламаторних ћелија, повећану пролиферацију фибробласта и значајну ангиогенезу. У дермису је примећена боља организација колагених влакана и смањен број полиморфонуклеарних ћелија, што указује на унапређену регенерацију коже. Поред тога, забележен је повећан број новоформираних крвних судова, што потврђује ангиогени потенцијал PCL/PEG скефолда са антибиотикима. Такође, на основу макроскопске анализе ране (Слика 35А) уочава се разлика у процесу зарастања и регенерације рана између скефолда, указујући на то да скефолди који садрже антибиотике значајно убрзавају процес зарастања опечене коже у поређењу са нетретираним подручјима.



Слика 35. Резултати процеса зарастања рана након третмана PCL/PEG скефолдима у *in vivo* условима. А) Макроскопска анализа зарастања рана у областима третираним само скефолдом у поређењу са третманом скефолда са цiproфлoксацином или гентамицином. Б) Репрезентативне слике Х&Е бојења парафинских делова негативне, позитивне контроле након третмана скефолдима без и са инкорпорираним цiproфлoксацином и гентамицином. SG: PCL/PEG скефолд, CSG: PCL/PEG скефолд са инкорпорираним цiproфлoксацином GSG: PCL/PEG скефолд са инкорпорисаним гентамицином. Ed: епидермис, Bm: Базална мембрана, De: дермис, F: фоликули длаке, S: лојна жлезда, C: колагена влакна, H: хиподермис, M: мишићна влакна, * област опекотина

Слични закључци се могу извести и из других истраживања, која су испитивала утицај антибиотика инкорпорираних у скефолде на процес зарастања рана. Резултати студије у којој су упоређивани чисти PCL скефолди и PCL скефолди са инкорпорираним антибиотикима показали су да је додавање антибиотика значајно унапредило регенеративни одговор на месту ране. (278) Према подацима друге студије везане за испитивање третмана нановлакна на процес зарастања дијабетичких рана, синтетисани скефолд комбинованог састава PVA/алгинат/свила је показао значајно убрзање процеса зарастања рана и смањени инфламаторни одговор након 14 дана у односу на контролу. (279) Осим тога, у другом сличном истраживању, влакна базирана на

PVA/PEO/хитозан/tragopon graminifolius комбинацији полимера показала су изузетно добар резултат у третману зарастања рана. Хистопатолошка анализа је показала мање присуство инфламаторних ћелија, већу густину колагених влакана дермиса и бољу регенерацију.(280).

Овакви резултати показују да специфичне комбинације полимера могу имати синергистички ефекат, где нису важна само структурна својства добијеног материјала, већ и њихова способност да обезбеде контролисано ослобађања активних агенаса који побољшавају регенерацију ткива. Ови резултати указују на то да ефикасност скефолда у процесу зарастања рана зависи не само од његових механичких и морфолошких својстава, већ и од способности скефолда да омогући контролисано и продужено ослобађање биолошки активних агенаса.

Резултати у оквиру овог истраживања су усклађени са добијеним *in vitro* резултатима, и јасно показују да примена PCL/PEG скефолда са инкорпорираним ципрофлоксацином значајно убрзава и побољшава процес зарастања рана. Посебну улогу у томе има присуство PEG компоненте у структури влакана, која омогућава лакшу дифузију хранљивих материја и тиме ствара повољну микросредину за опстанак и активност ендотелних и фибробластних ћелија. Додатак ципрофлоксацина у овакву полимерну матрицу је омогућио ефективну антимикуробну заштиту и значајно смањио ризик од инфекције, што је посебно важно у иницијалним фазама зарастања ране. Такође, присуство ципрофлоксацина није ометало ћелијску активност, већ је подстакло регенеративни одговор, што је потврђено и патохистолошким анализом.

Способност скефолда да симултано подрже биолошке процесе регенерације, смање инфламацију и контролишу појаву инфекција чини их изузетно обећавајућим материјалима у домену ткивног инжењеринга. Додатна истраживања и оптимизација би омогућила развој још ефикаснијих вештачких материјала за клиничку примену у будућности.

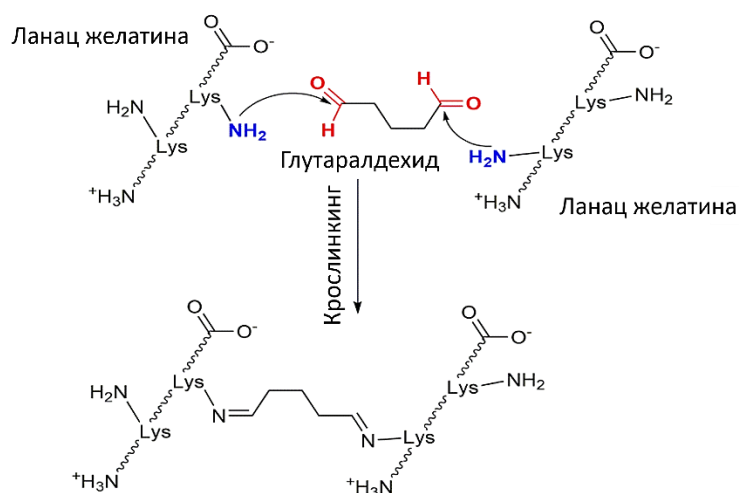
4.2 Део 2. Протеински скефолди

4.2.1 Процес умрежавања скефолда (crosslinking)

Желатин је класификован као хидрофилни полимер због високог садржаја функционалних група као што су хидроксилне и карбоксилне групе, које омогућавају јаке водоничне везе и високу растворљивост у води. Међутим, управо та растворљивост представља ограничење при примени желатина у ткивном инжењерингу, јер у контакту са физиолошком средином долази до деградације структуре.

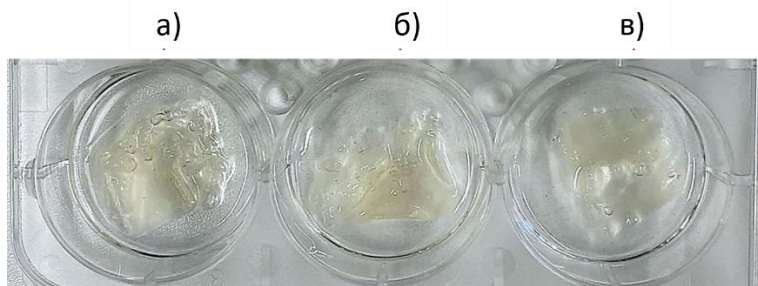
У овом истраживању спроведен је поступак хемијског умрежавања са циљем побољшања стабилности скефолда желатина. Као агенс за умрежавање је коришћен глутаралдехид (GA), један од најчешће коришћених агенаса у ове сврхе. Основни принцип механизма се заснива на формирању ковалентне везе са желатином, при чему се редукује његова растворљивост и побољшава структурни интегритет. Хемијска реакција умрежавања између глутаралдехида и желатина илустрована је на **Слици 36**.

Умрежавање је спроведено излагањем скефолда желатина парама глутаралдехида у трајању од 6 сати. Након третмана, добијени узорци су потопљени у фосфатни пуфер (PBS) како би се симулирали физиолошки услови (37°C, 5% CO₂). Умрежена влакна показала су смањену растворљивост и очувану структуру након потапања, што указује на ефикасност употребљеног агенса и самог процеса.



Слика 36. Механизам реакције умрежавања желатина глутаралдехидом

Добијени узорци након умрежавања у физиолошкој средини су приказани на **Слици 37**.



Слика 37. Стабилност умрежених скефолда желатина у PBS раствору. а) желатин б) желатин/0.1% ципрофлоксацин, в) желатин/0.1% гентамицин

Специфична структура желатина захтева стабилизацију како би се омогућила његова примена у биомедицинским истраживањима. Како је утврђено у овом истраживању, влакна желатина се лако растварају у физиолошким условима, што је последица хемијске структуре желатина. У присуству водене средине, желатин се потпуно раствара због присуства поларних функционалних група, као што су аминок, карбоксилне и хидроксилне групе. Водоничне везе између ових функционалних група играју кључну улогу у стабилизацији примарне троланчане спиралне структуре желатина и његовог понашања у различитим условима. (281) У циљу спречавања брзе деградације, примењен је процес хемијског умрежавања помоћу глутаралдехида, бивалентног алдехида са две реактивне алдехидне групе (-CHO), које омогућавају ковалентно везивање са протеинским молекулима. Основни механизам умрежавања се заснива на реакцији између карбонилних група глутаралдехида и ϵ -амино група (лизина) у структури желатина, што резултира формирањем стабилних амидних и шифових (имино) веза. (282) Таква реакција доводи до редукције степена хидролизе желатина кроз интеракцију глутаралдехида са хидрофилним деловима протеина (Слика 36). Овај процес доводи до значајног смањења хидрофилности и растворљивости материјала, истовремено подстичући ренатурацију троструких спиралних структура желатина, чиме се додатно побољшава механичка и хемијска стабилност. Дуготрајна реакција омогућава да неке од насталих имино веза даље прелазе у амидне везе, чиме долази до модификације хемијске структуре полимера. На тај начин, спречава се тренутна растворљивост и деградација у физиолошким условима.

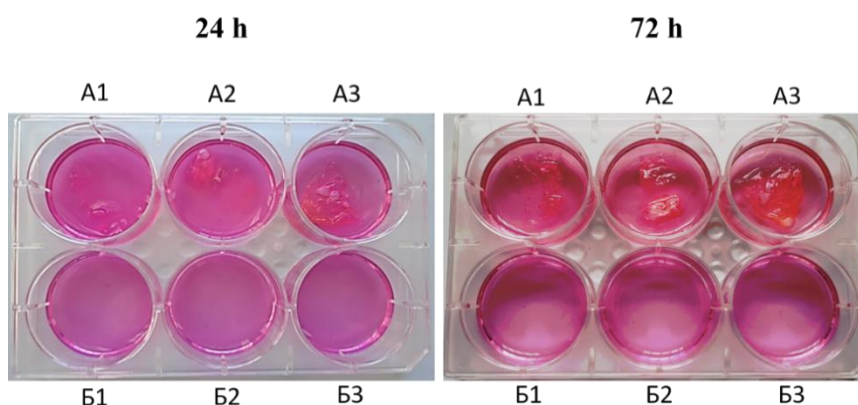
Међутим, иако употреба глутаралдехида доприноси стабилизацији влакана, постоје потенцијални негативни ефекти везани за цитотоксичност и биокомпатибилност материјала након умрежавања, посебно при употреби већих концентрација или у присуству остатка агенса у скефолду. Према објављеним литературним подацима, потенцијална токсичност се може избећи или смањити оптимизацијом процеса и уклањањем преосталог глутаралдехида након третмана умрежавања, што знатно смањује ризике и омогућава његову примену у биомедицини (283). Са циљем минимизације последица процеса умрежавања, у овом истраживању је оптимизована и смањена концентрација раствора глутаралдехида, а уместо директног излагања примењена је његова пара. Након тога, преостали неизреаговани остатак у скефолдима је уклоњен вакуумским третманом, чиме је додатно осигурана нетоксичност материјала. Сличан приступ су описали F. Banafati Zadeh и сар., који су успешно извели процес умрежавања електроспинованих скефолда желатина помоћу глутаралдехида, при чему су посебан акценат ставили на његову примену у изради биопротетских имплантата. (284)

4.2.2 Утицај киселости и рН вредности влакана на физиолошку средину

рН вредност медијума је један од кључних фактора који утиче на ћелијско понашање, пролиферацију, диференцијацију и одрживост ћелија живог организма. Оптималан рН је неопходан за одржавање хомеостазе и активности различитих биохемијских процеса унутар ћелија.

У оквиру овог истраживања, разматран је утицај различитих компоненти скефолда на рН вредност медијума. Иако се растварачи попут сирћетне киселине, која у овом истраживању представља примарни растварач, теоретски испаравају током процеса електроспининга, њихов резидуални остатак може значајно утицати на својства нановлакна, укључујући токсичност, стопу разградње и биокомпатибилност. Осим тога, употреба глутаралдехида као агенса за умрежавање може такође утицати на рН вредност медијума.

У складу са тим, избор и оптимизација концентрације растварача представљају кључне кораке у дизајнирању биокомпатибилних и функционалних скефолда. Добијени резултати експеримента где се испитивао утицај скефолда желатина на вредност медијума након 24 и 72 сата су визуелно приказани на **Слици 38**. Контролни узорци (медијум без скефолда) су показали рН вредност од 8.2, што одговара благо алкалном окружењу. Додавање скефолда у медијум, без обзира на присуство антибиотика, довело је до смањења рН на 7.7 након 24 сата, што указује на кретање ка физиолошки прихватљивом опсегу и на повољне услове за раст ћелија (7.4 ± 0.2). Утврђено је да нема значајне разлике у рН вредностима између скефолда са антибиотикима и без антибиотика након 24 и 72 сата. Након 72 сата инкубације, рН вредност медијума и даље се благо снижава на 7.5, што је праћено променом боје медијума из црвене у светло наранџасто-ружичасту. Ова промена указује на постепену неутрализацију алкалних компоненти медијума и могућу иницијалну деградацију скефолда.



Слика 38. рН евалуација скефолда након 24 и 72 сата у медијуму; А1– желатин без антибиотика, А2 – желатин/0,1% ципрофлоксацин и А3 – желатин/0,1% гентамицин скефолди; Б1, Б2, Б3 – Контролни медијум

Присуство сирћетне киселине може значајно утицати на карактеристике скефолда, које могу имати штетне последице на вијабилност ћелија, као и друге биолошке процесе. Према литературним подацима, сирћетна киселина се показала као ефикасан растварач за желатин, будући да њене веће концентрације смањују површински напон, чиме побољшавају проводљивост и истовремено смањују гелирање

полимерног раствора повећањем вискозитета. (285), (286) Ова својства омогућавају стабилнији процес електроспиновања, што резултира формирањем хомогених влакана.

У овом истраживању су такође коришћене веће концентрације растварача, 70% сирћетна киселина је служила за растварање желатина. Иако је познато да веће концентрације сирћетне киселине могу утицати на биолошке процесе, важно је напоменути да значајан део овог растварача испарава током процеса, чиме се минимизира његово присуство у синтетисаним скефолдима. (287), (288) Претходне студије су показале да скефолди желатина добијени уз помоћ сирћетне киселине не показују киселе особине у физиолошким условима, што је кључно приликом процене њихове цитотоксичности. (289), (290)

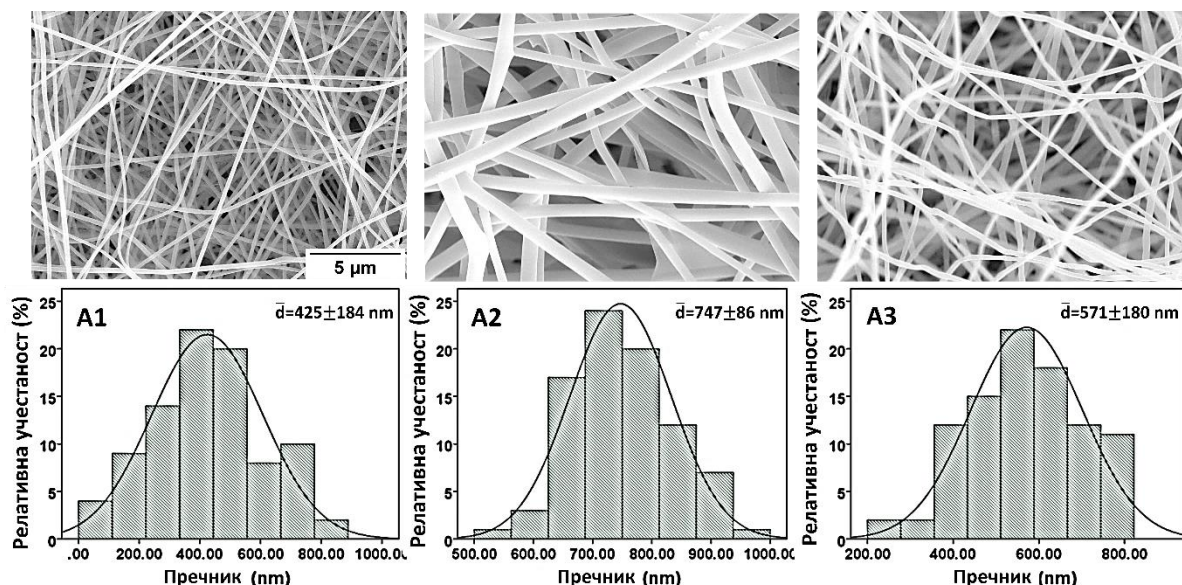
Резултати овог истраживања су у складу са литературним подацима. Измерене рН вредности умрежених скефолда желатина (после 24 и 72 сата) указују на стабилност у опсегу физиолошки прихватљивих вредности, што подржава раст и пролиферацију ћелија. Није уочена значајна промена рН вредности медијума, што указује да је и концентрација резидуалног глутаралдехида била минимална или је успешно уклоњена током процеса припреме скефолда. Такође, утврђено је да не постоје значајне разлике у рН вредностима између скефолда са и без антибиотика, што указује на то да су изабране оптималне концентрације које не утичу на кисело-базну равнотежу медијума. Ова анализа пружа значајне прелиминарне податке о кисело-базним својствима скефолда, што је посебно од значаја за испитивање њихове потенцијалне цитотоксичности и биолошке компатибилности.

4.2.3 Морфолошка карактеризација влакана желатина

Морфолошка анализа умрежених влакана желатина извршена је применом SEM методе, чиме су добијене детаљне информације о структури и геометрији влакана. SEM микрографије узорака нановлакна без антибиотика, као и оних са инкорпорираним антибиотикима, приказане су на **Слици 39**. На основу добијених микрографија, може се уочити да су сва испитивана влакна формирала глатке, насумично распоређене и хомогено дистрибуиране структуре, без дефеката који би указивали на недоследности у процесу електроспиновања.

За детаљнију анализу морфолошких карактеристика, извршена су мерења пречника влакана коришћењем софтвера ImageJ. Дистрибуција пречника је представљена у виду хистограма дуж SEM микрографија, чиме је омогућено визуелно поређење сва три испитивана узорка. Средња вредност пречника влакана ($\bar{d}$) желатина без антибиотика износила је 425 nm, док влакна која садрже инкорпориране антибиотике су показала тенденцију ка повећању пречника. Средња вредност пречника влакана желатина са ципрофлоксацином и гентамицином су износила 747 nm и 571 nm (**Слика 39**). Занимљиво је да је присуство антибиотика изазвало структурне промене у влакнима, што је резултирало повећаним пречником. Ова промена у морфологији може се објаснити варијацијама у вискозности и проводљивости раствора након додатка антибиотика у раствор полимера, као и могућим међумолекулским интеракцијама између желатина и антибиотика. Присуство молекула антибиотика може утицати на физичко-хемијска својства полимерних раствора, као што су површински напон и кинетика формирања влакана, што може довести до варијација у вредностима пречника добијених влакана. Поређењем вредности пречника влакана, није уочена значајна разлика у пречнику између узорака желатина са 0.1% ципрофлоксацином и 0.1%

гентамицином, иако су влакна са инкорпорираним ципрофлоксацином имали већу вредност пречника (747 nm).



Слика 39. SEM слике и дистрибуција пречника влакана A1- влакна желатина без антибиотика, A2 – желатина/0.1% ципрофлоксацина, A3 – желатина/0.1% гентамицина

Додавање антибиотика, као што су ципрофлоксацин и гентамицин, растворених у дестилованој води пре додавања желатина у раствор, може да утиче на електричну проводљивост самог раствора, што вероватно има за последицу промене у морфолошкој структури добијених влакана. Познато је да електропроводљивост раствора игра кључну улогу у процесу електроспиновања, и у овом случају додавање антибиотика растворених у води довело је до разблаживања сирћетне киселине у раствору полимера, што је резултовало смањеном концентрацијом јона у систему и самим тим смањењем проводљивости раствора. Сирћетна киселина је важан фактор у овом процесу, јер њена дисоцијација у раствору обезбеђује присуство H^+ јона који повећавају проводљивост. Разблажење сирћетне киселине додатком воде доводи до смањења броја расположивих јона, при чему долази до смањења проводљивости. Како проводљивост опада, смањује се и способност раствора да формира стабилну структуру под дејством електричног поља. Као резултат тога, потребно је применити већи напон како би се одржао континуалан процес електроспиновања, одговарајућа динамика млаза и омогућило адекватно формирање влакана, а повећањем напона долази до формирања влакана са већим пречницима. (291)

Влакна желатина која садрже ципрофлоксацин и гентамицин показала су повећане вредности пречника у поређењу са вредностима влакана чистог желатина без антибиотика, што додатно потврђује да смањена проводљивост услед разблаживања сирћетне киселине игра пресудну улогу у морфологији добијеног материјала.

Резултати овог истраживања су у складу са претходно објављеним истраживањима, која су испитивала ефекат антибиотика на морфологију електроспинованих влакана. На пример, у једној студији је утврђено да је додавање ципрофлоксацина у желатин/PCL влакна, значајно повећало пречник добијених влакана

са 234.2 ± 98.2 nm на 518.1 ± 167.9 nm, што указује на снажан утицај овог антибиотика на морфолошке карактеристике добијених скефолда. (291) Слично томе, присуство гентамицина у желатин/PVA влакнима довело је до повећања пречника, што додатно потврђује да интеракција антибиотика са структуром полимера може утицати на промену морфолошких особина електроспинованог скефолда. (292) Поред ефекта антибиотика, значајан утицај на морфологију влакана желатина у овом истраживању је имао и процес умрежавања помоћу глутаралдехида. Претходне студије су показале да процес умрежавања такође утиче на морфолошке особине влакана при чему долази до благог повећања пречника влакана, што је у складу са резултатима овог експеримента. (293) Овај ефекат се може објаснити чињеницом да процес умрежавања доводи до повећања крутости полимера, и на тај начин утиче на морфолошке особине скефолда. Поред тога, глутаралдехид реагује са аминским групама желатина, стварајући стабилнију и чвршћу структуру, што може резултирати формирањем влакана већих пречника. Међутим, овакве промене у морфологији влакана могу имати позитивне ефекте, нарочито у области ткивног инжењерства. Влакна незначајно већих пречника су посебно важна у иницијалним фазама регенерације ткива, јер могу обезбедити погоднију структуру за миграцију, адхезију и пролиферацију ћелија. Ово је нарочито битно за процес неогенезе, где формирање нових крвних судова зависи и од геометријске структуре и порозности скефолда. У раним фазама овог процеса, недовољно снабдевање ткива крвљу представља значајан изазов, а порознија структура са релативно већим пречницима влакана може побољшати дифузију хранљивих материја и кисеоника, чиме се поспешује интеграција и растање ткива. (294) Добити резултати су у складу са претходним научним истраживањима и пружају информације о утицају антибиотика и процеса умрежавања на морфологију влакана. Оваква анализа морфолошких карактеристика скефолда доприноси бољем разумевању њиховог потенцијала за имитацију ванћелијског матрикса коже.

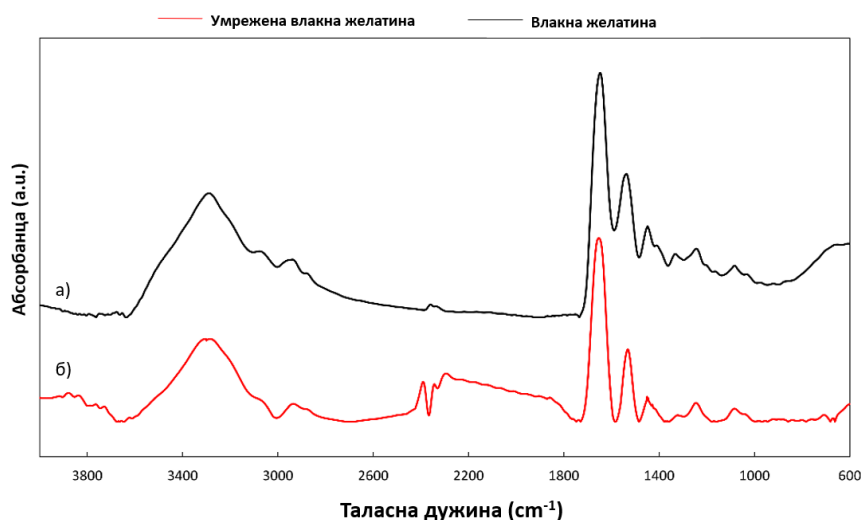
4.2.4 FTIR и EDS анализа

Одређивање присуства антибиотика унутар структуре влакана желатина, као и процена њихове стабилности након умрежавања је извршено коришћењем FTIR и EDS спектроскопије. FTIR анализа је спроведена ради компаративне процене неумрежених и умрежених нановлакна са инкорпорисаним антибиотикима, чиме је омогућена идентификација карактеристичних функционалних група и потенцијалних промена у хемијској структури због процеса умрежавања помоћу глутаралдехида. (295)

FTIR спектар неумрежених влакана желатина показао је присуство карактеристичних пикова који потврђују хемијску структуру желатина. Најизраженији пик на 1647 cm^{-1} одговара амид-I групи и потиче од C=O групе, што указује на присуство пептидних веза у структури желатина. Пик на 1537 cm^{-1} приписује се амид-II вибрацијама, које укључују присуство N-H и C-N веза, док је пик на 1243 cm^{-1} повезан са амид-III групом. Оштар пик на 3288 cm^{-1} , који се приписује амид-A групи, указује на присуство N-H везе, што је карактеристично за структуре протеина. Такође, присуство воде у узорцима је потврђено ширим пиком на 1640 cm^{-1} , док пик на 1044 cm^{-1} одговара C-O вези, што је карактеристично због присуства поларних група у структури желатина. (296) Поређењем FTIR спектра неумрежених и умрежених влакана желатина (**Слика 40**) могу се уочити значајне разлике које указују на структурне модификације настале услед реакције умрежавања.

Након процеса умрежавања влакана желатина помоћу паре глутаралдехида, уочене су значајне промене у FTIR спектрима испитиваних влакана, што указује на

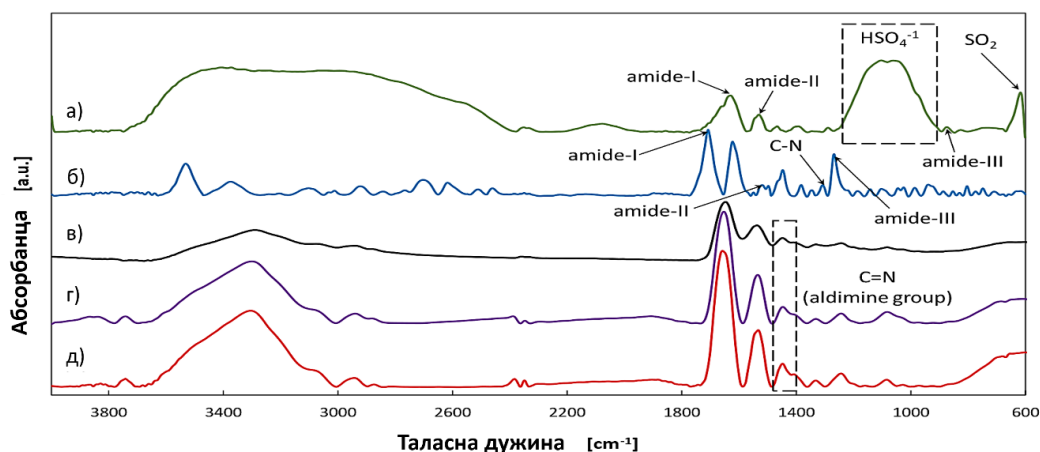
успешну модификацију хемијске структуре. Спектрална анализа умрежених влакана показала је карактеристична померања пикова у односу на неумрежена влакна, што је последица интеракција између реактивних функционалних група желатина и глутаралдехида. Најизраженији пик у FTIR спектру умрежених влакана забележен је на 1653 cm^{-1} и одговара амид-I групи (C=O), што је у складу са структуром протеина након умрежавања. Додатно, пик на 1530 cm^{-1} , који се приписује амид-II групи и пик на 1245 cm^{-1} , који одговара амид-III групи, потврђују очување примарне структуре протеина након процеса умрежавања. Пик на 3283 cm^{-1} , који је повезан са амид-A групом, указује на присуство интрамолекуларних и интермолекуларних водоничних веза.



Слика 40. Влакна желатина пре умрежавања (а) и GA-умрежена влакна желатина (б)

Кључан доказ успешног умрежавања је појава новог пика на 1450 cm^{-1} , који се приписује алдиминској (C=N) вези, што је у складу са формирањем ковалентних веза између аминских група желатина и алдехидних група глутаралдехида. Ови резултати потврђују да је реакција умрежавања довела до формирања стабилне мреже унутар структуре влакана, чиме је значајно побољшана њихова отпорност на хидролизу у воденој средини. (297)

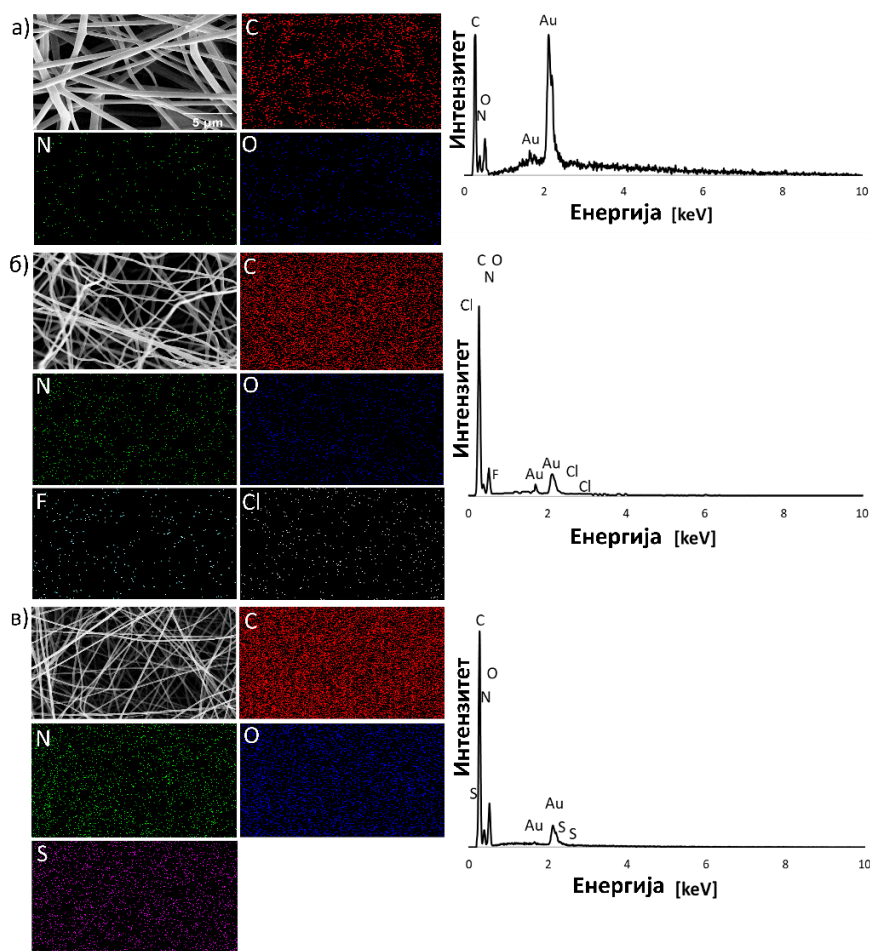
Слика 41 приказује спектралну анализу прашкастих облика антибиотика, као и влакана желатина са и без инкорпорираних антибиотика. Спектри умрежених влакана са антибиотикима показали су исте карактеристичне пикове, као и умрежени узорци без антибиотика: 1653 cm^{-1} (амид-I), 1530 cm^{-1} (амид-II), 1245 cm^{-1} (амид-III) и 3283 cm^{-1} (амид-A). Ово указује да присуство антибиотика није значајно утицало на основну структуру желатина. Ипак, FTIR спектри показују да је додатак антибиотика довео до суптилних промена у интрамолекуларним и интермолекуларним интеракцијама унутар матрикса влакана. Присуство антибиотика може утицати на водоничне везе, што потенцијално доводи до мањих померања пикова или варијација у њиховом интензитету. Поред тога, присуство глутаралдехида у систему резултирало је формирањем стабилних ковалентних веза, као и алдиминске (C=N) везе на 1450 cm^{-1} , чиме се додатно потврђује успешност процеса умрежавања. Присутност интермолекуларних интеракција услед умрежавања глутаралдехидом је потврђено променама у спектру.



Слика 41. FTIR спектри прашкастог агенса гентамицин сулфата (а), ципрофлоксацин хидрохлорида (б), влакана желатина (в), желатин/0.1% гентамицин влакана (г) и желатин/0.1% ципрофлоксацин влакана (д)

FTIR анализа прашкастог узорка гентамицина показала је карактеристичне пикове на 1630 cm^{-1} , 1533 cm^{-1} и 1247 cm^{-1} , који се могу приписати амид-I, амид-II и амид-III групама гентамицина. Пик на 1062 cm^{-1} указује на присуство HSO_4^- групе, док је пик на 617 cm^{-1} повезан са присуством SO_2 . (298) Слично томе, FTIR спектар прашкастог узорка ципрофлоксацина показао је пикове на 1623 cm^{-1} , 1519 cm^{-1} и 1269 cm^{-1} , који одговарају амид-I, амид-II и амид-III групама ципрофлоксацина. Додатни пик на 1281 cm^{-1} , који је последица присуства C-H везе. (299) Скефолди желатина са инкорпорираним антибиотикима показали су пик на 1450 cm^{-1} у FTIR спектру, који указује на присуство процеса умрежавања глутаралдехидом. Међутим, карактеристични пикови за гентамицин и ципрофлоксацин, као што су амид-I, амид-II и амид-III групе, нису били видљиви у добијеном спектру. Ово се може објаснити ниским концентрацијама инкорпорираних антибиотика у скефолду или преклапањем са јаким пиковима који припадају основној структури желатина. (300) Због тога је, у циљу додатне потврде присуства и потенцијалног везивања антибиотика унутар скефолда, примењена енергетска дисперзивна спектроскопија (EDS), која пружа више информација о расподели елемената у узорцима.

EDS мапирање је приказано на **Слици 42** и показује расподелу елемената у влакнима желатина без антибиотика, као и у влакнима са додатком 0.1% ципрофлоксацина и 0.1% гентамицина. Хемијска структура ципрофлоксацин хидрохлорида садржи флуор (F) и хлор (Cl), док структура гентамицин сулфата садржи сумпор (S). Како је приказано на мапама слике, елементи F, Cl и S су равномерно распоређени унутар влакана, што указује на успешно инкорпорирање антибиотика у структури скефолда, без појаве агрегација или нехомогености у расподели. Ови резултати додатно потврђују стабилност антибиотика у материјалу, као и њихово успешно инкорпорирање.



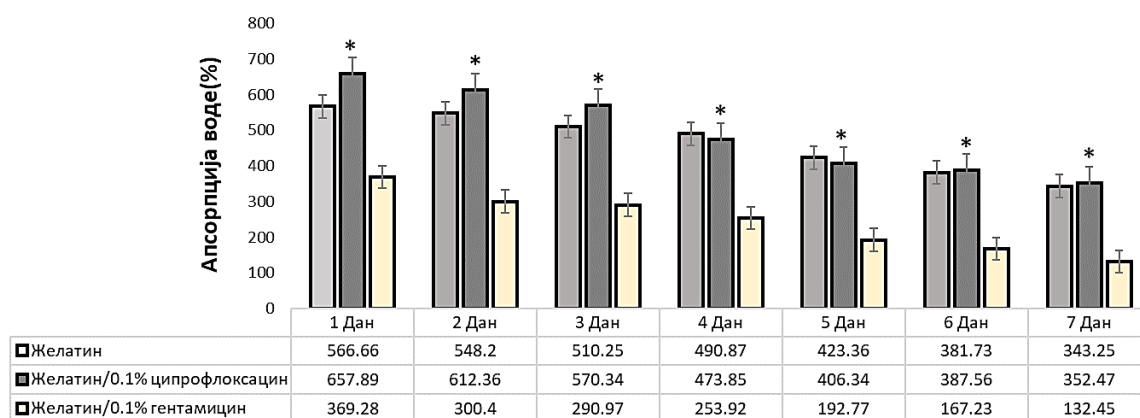
Слика 42. Елементарно мапирање и EDS спектри влакана желатина: а) без антибиотика, б) са 0.1% ципрофлоксацина, в) са 0.1% гентамицина

У овом истраживању, EDS анализа је коришћена за потврду успешне инкорпорације антибиотика у скефолде желатина. Расподела елемената утврђена EDS анализом потврдила је присуство додатних елемената специфичних за антибиотике, као што су флуор (F), хлор (Cl) и сумпор (S), који нису присутни у чистом желатину, али су саставни делови молекула ципрофлоксацин хидрохлорида и гентамицин сулфата. **Слика 42** илуструје елементарну дистрибуцију, која је у складу са атомским саставом ових антибиотика, пружајући директан доказ њихове хомогене интеграције у влакнима. Комбиновањем FTIR и EDS техника омогућено је свеобухватно испитивање. FTIR спектроскопија је омогућила увод у функционалне групе и интеракције унутар структуре, док је EDS обезбедио просторну визуализацију расподеле елемената антибиотских агенаса. Резултати су у складу са претходним студијама које су такође показале да, иако FTIR често не детектује инкорпориране агенсе ниских концентрација, EDS техника може пружити доказе о њиховом присуству. (301)

4.2.5 Испитивање степена апсорпције и деградације

Степен апсорпције

Степен апсорпције воде и кинетика овог процеса представљају кључне параметре који утичу на физиолошке функције скефолда, укључујући размену гасова, транспорт течности и управљање ексудатом. У циљу процене капацитета скефолда желатина да апсорбује воду, раствор PBS-а је коришћен као модел физиолошке средине. На **Слици 43** приказан је дијаграм који илуструје зависност апсорпционог капацитета од времена апсорпције воде за скефолде са и без додатих антибиотика.



Слика 43. Дијаграм апсорпције воде скефолда желатина са и без антибиотика током 7 дана инкубације у PBS-у (pH 7,4, 37 °C). Подаци су приказани као средња вредност $\pm$ SD за дупле експерименте. * Представља статистичку значајност од узорка желатина/0.1% гентамицин, $p < 0.05$

Резултати експеримента показују да капацитет апсорпције воде варира у зависности од хемијске структуре антибиотика у структури скефолда. Почетна фаза апсорпције је обележена наглим повећањем апсорпције у првим данима, што је било праћено постепеним успоравањем стопе апсорпције. Ова динамика може бити повезана са отварањем порозне структуре скефолда желатина, која касније достиже своју максималну могућност апсорпције воде. Промене у капацитету апсорпције воде су биле најизраженије у првим данима, што говори о изузетној способности ових скефолда да брзо упијају воду. Највиши капацитет апсорпције воде је постигнут након 1. дана при чему су скефолди желатина без антибиотика имали капацитет од 566.66%. Међутим, највиши капацитет је био код узорка који садржи 0.1% ципрофлоксацина (657.89%), што указује на утицај антибиотика на структуру и хидрофилност скефолда. За узорак желатин/0.1% гентамицин, капацитет апсорпције воде је износио 369.28%, што је било доста мање у поређењу са резултатима за узорак желатин/0.1% ципрофлоксацин и чисти желатин.

Висок степен апсорпције воде код узорака желатина без антибиотика може се објаснити присуством јаким поларних група, као што су аминок и карбоксилне групе, које имају тенденцију да формирају водоничне везе са молекулима воде. Ове поларне групе су одговорне за високу хидрофилност желатина и његову способност да брзо апсорбује воду. Такође, додавање антибиотика као што су ципрофлоксацин и гентамицин може утицати на хидратациону динамику, при чему ципрофлоксацин показује нешто виши капацитет апсорпције, што може бити повезано са његовом хемијском структуром и интеракцијом са поларним групама у желатину.

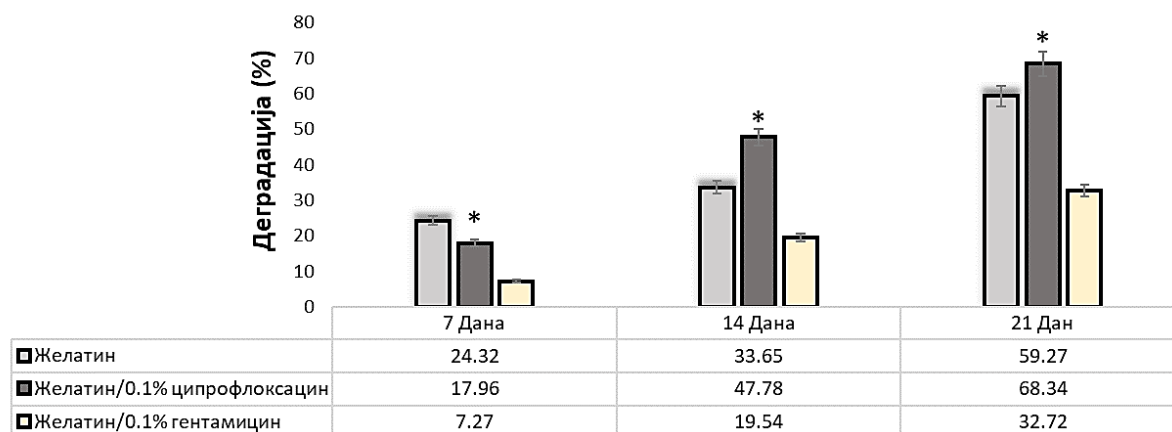
Након седмог дана испитивања, капацитет апсорпције воде за скефолде желатина без антибиотика, као и за узорке са 0.1% ципрофлоксацина и 0.1% гентамицина, износио је 343.25%, 352.47% и 132.45%. Ови резултати указују на то да желатин/0.1% ципрофлоксацин и даље показује највиши капацитет апсорпције воде у поређењу са чистим желатином и желатин/0.1% гентамицин скефолдима, и указује на то да присуство ципрофлоксацина у структури материјала може допринети повећању хидрофилности и способности задржавања воде. Занимљиво је да желатин/0.1% гентамицин скефолд показао најнижи капацитет апсорпције воде у свим испитиваним временским тачкама, при чему је његова вредност након седмог дана била приближно упола мања у односу на желатин/0.1% ципрофлоксацин. Ова разлика је нарочито уочљива када се упоређи са чистим желатином, који је показао знатно већи капацитет апсорпције течности. Способност апсорпције воде код желатин/0.1% гентамицин узорка била је скоро два пута нижа у поређењу са желатин/0.1% ципрофлоксацин узорком. Такав резултат указује на то да присуство гентамицина у скефолду утиче на редукцију хидрофилности материјала (Слика 43).

Побољшана апсорпција воде у случају желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолда може се приписати већем пречнику влакана, што је раније у литератури повезано са повећаном апсорпцијом унутар структуре скефолда. (54) Са друге стране, ципрофлоксацин, због своје структуре која садржи флуор (F) и карбоксилне групе (-COOH), може побољшати капацитет апсорпције воде кроз интеракције са поларним групама желатина, чиме се повећава могућност задржавања воде у скефолду. Смањена апсорпција код желатин/0.1% гентамицин скефолда може се објаснити структурним карактеристикама гентамицина. Присуство донорских група (-NH₂ и -OH) омогућава снажну интеракцију са слободним групама унутар структуре желатина, и самим тиме интеракција ограничава додатно везивање молекула воде, што објашњава добијене резултате. (302) Упркос нижој апсорпцији воде у случају желатин/0.1% гентамицин узорка, он и даље показује релативно висок капацитет задржавања воде, што омогућава ефикасну апсорпцију ексудата из ране, чиме се обезбеђује њихова погодност за примену у домену зарастања рана. Осим тога, бржа апсорпција воде у одређеним случајевима може негативно утицати на зарастање рана, повећавајући ризик од настанка инфекција. (303)

Ови резултати показују да састав скефолда и тип антибиотика који је инкорпориран у структуру желатина значајно утичу на капацитет апсорпције воде. Повећана апсорпција воде у присуству ципрофлоксацина може бити пожељна у доменима примене, где је неопходно одржавање влажне средине, док смањен капацитет апсорпције код желатин/0.1% гентамицин скефолда може имати предност у условима, где је потребно смањити задржавање вишка течности и контролисати ослобађање активне супстанце.

Степен деградације

Као што је примећено, висок поларитет желатина због присуства поларних група убрзава хидролизу у воденој средини. **Слика 44** приказује стопу деградације скефолда желатина у физиолошким условима на 37°C током 21 дана. Добијени резултати су показали да је већ након 7. дана присутна делимична разградња свих испитиваних скефолда, при чему није уочена значајна разлика у проценту деградације између чистог желатина и желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолда. Међутим, најнижа стопа деградације примећена је код узорака желатин/0.1% гентамицин скефолда, што указује на потенцијално стабилизирајуће дејство овог антибиотика на структуру скефолда.

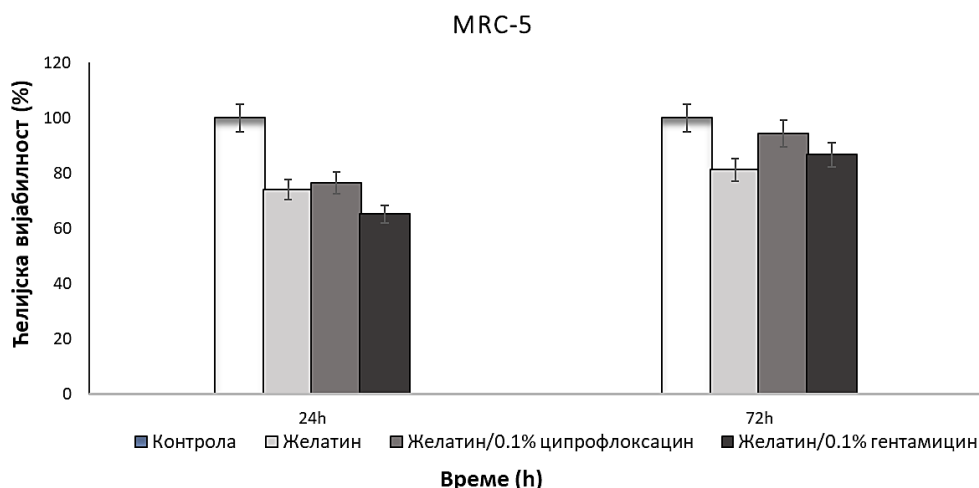


Слика 44. Профил разградње скефолда желатина са и без антибиотика током 21 дана инкубације у PBS-у (pH 7.4, 37 °C). Подаци су приказани као средња вредност $\pm$ SD за дупле експерименте. * Представља статистичку значајност од желатин/0.1% гентамицина, $p < 0.05$

Крајем експерименталног периода (21. дан), највиша стопа разградње забележена је код узорка желатин/0.1% ципрофлоксацин (68.43%), затим код чистог желатина (59.27%), док је најнижа вредност била за желатин/0.1% гентамицин скефолд (32.72%). Добијени резултати корелирају са степеном апсорпције воде код истих узорака, што указује на снажну повезаност хидрофилности материјала и његове деградабилности. Бржа разградња желатин/0.1% ципрофлоксацин узорка може се приписати додатном присуству поларних функционалних група у структури ципрофлоксацина ($-\text{NH}$ и $-\text{COOH}$), које смањују интеракције са структуром желатина и омогућавају више места за везивање воде. Ове карактеристике убрзавају процес хидролизе и разградње. Са друге стране, желатин/0.1% гентамицин скефолди показују најспорију стопу разградње, што је последица јаче интеракције гентамицина са хидрофилним групама желатина. Донорске групе гентамицина ($-\text{NH}_2$ и $-\text{OH}$) формирају стабилне везе са матриксом желатина, што повећава његову отпорност на хидролизу. Закључак овог експеримента јесте да желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолди показују бржу разградњу и повећану апсорпцију воде, док желатин/0.1% гентамицин скефолди нуде већу стабилност и отпорност на хидролизу.

4.2.6 Испитивање цитотоксичности и вијабилности

In vitro тест цитокомпатибилности добијених скефолда (желатин без антибиотика, желатин/0.1% ципрофлоксацин и желатин/0.1% гентамицин) је спроведен на MRC-5 ћелијској линији након 24 и 72 сата инкубације (Слика 45).



Слика 45. Резултати теста цитотоксичности на MRC-5 ћелијској линији након третмана чистим желатином и желатин/0.1% ципрофлоксацин и желатин/0.1% гентамицин скефолдима након 24 и 72 сата

Добијени резултати показују да сва три типа скефолда испољавају високу биокомпатибилност, без присуства цитотоксичних ефеката, док истовремено подстичу ћелијску адхезију и пролиферацију током инкубације. Након 24 сата инкубације, проценат вијабилних ћелија на скефолдама без антибиотика, са ципрофлоксацином и са гентамицином износио је 74.05%, 76.53% и 65.23%, респективно. Ова почетна разлика у пролиферацији може бити последица интеракција антибиотика са ћелијском мембраном, као и разлика у хемијској структури антибиотика која утиче на њихову активност скефолда. Након 72 сата инкубације, дошло је до значајног повећања броја ћелија на свим испитиваним скефолдама, при чему су највеће вредности биле за желатин/0.1% ципрофлоксацин (94.37%), затим за желатин/0.1% гентамицин (86.76%) и чист желатин (81.34%). Добијени тренд је био стабилан код свих типова скефолда, што потврђује да желатин пружа одговарајућу подлогу за адхезију и раст ћелија фибробласта. Скефолди са импрегнираним антибиотикима, посебно са ципрофлоксацином, показали су знатно побољшану пролиферацију ћелија у односу на чисти желатин, што може указивати на то да одређени антибиотици могу деловати као стимулативни фактори за ћелијски раст. Такође, овај ефекат може бити последица могућег антимикробног дејства које смањује појаву бактерија и самим тим омогућава адекватан и неометан раст ћелија. (301)

Ослањајући се на литературне податке, бројне студије потврђују високу цитокомпатибилност различитих материјала на бази природних и синтетичких полимера. У једној од таквих студија, у којој је испитиван PCL/желатин скефолд, показано је да синтетисани скефолд подржава раст и вијабилност ћелија, са вредностима од 96.8%, 97.1% и 98.4% након 24, 48 и 72 сата инкубације, респективно. (304) Резултати друге студије, где су испитивани скефолди на бази природних полимера и неорганских компонената - лигнин/агароза/свилени фиброин/ $ZnCr_2O_4$, добијени резултати су показали ћелијску вијабилност већу од 90% након 3 дана инкубације на Nu02 ћелијама здравих фибробласта коже.

Присуство природних полимера у скефолду често доприноси већој вијабилности здравих ћелија, захваљујући структури сличној ванћелијском матриксу. Додавање желатина синтетичким полимерима може побољшати биокомпатибилност синтетисаног

материјала и омогућити нормално одвијање биолошких процеса. Важно је напоменути да у овом истраживању, присуство сирћетне киселине и резидуалног GA није негативно утицало на пролиферацију ћелија. Ово указује на ефикасно испаравање сирћетне киселине током процеса електроспиновања, као и на одсуство инхибиторних ефеката глутаралдехида на ћелијску активност у структури влакана. Штавише, резултати једне студије су забележили да скефолди умрежени глутаралдехидом, показали су се као ефикасни носачи за подстицање раста и пролиферације ћелија фибробласта и ендотела. (305)

4.2.7 Анализа антибактеријске активности

Желатин је познат по својим антимикуробним својствима захваљујући својој специфичној хемијској структури. Протеински остаци желатина, као што су глицин, пролин и хидроксипролин, могу ометати интегритет ћелијских зидова бактерија, што доводи до инхибиције њиховог раста. (306) Поред тога, хидрофилна природа желатина игра важну улогу у редукцији бактеријске адхезије на површини скефолда. Антимикуробна активност скефолда у овом истраживању анализирана је методом диск дифузије против грам-позитивне бактерије *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и грам-негативне бактерије *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Резултати су показали да узорци чистог желатина имају одређену способност инхибиције раста ових бактерија (Табела 10). Ова активност се може приписати интеракцији желатина са бактеријским ћелијским зидом, као и његовој способности да апсорбује и регулише количину хранљивих и антимикуробних супстанци. Занимљиво је да висока способност желатина да апсорбује воду не само да побољшава биодоступност хранљивих материја за ћелије домаћина, већ и ограничава стварање микробних биофилмова, који су кључни фактор у резистенцији бактеријских инфекција. Међутим, скефолди желатина са импрегнираним антибиотикима показују значајно израженију антимикуробну активност у односу на чист желатин, при чему су ефекти слични ефектима чистих антибиотика у контролним групама.

У случају *S. aureus* ATCC 25923, инхибиторни ефекти скефолда са антибиотикима (желатин/0.1% ципрофлоксацин и желатин/0.1% гентамицин) су једнаки ефектима истих антибиотика на филтер папиру. За *P. aeruginosa* ATCC 27853, примећене су одређене разлике: код желатин/0.1% гентамицин скефолда се уочава појачано деловање у односу на контролу, док је код желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолда антимикуробна активност била благо смањена у односу на контролу (Табела 10). Пречник зоне инхибиције раста бактерија око скефолда са антибиотикима био је у складу са деловањем стандардних антибиотских дискова, при чему је желатин/0.1% ципрофлоксацин показао посебно изражену активност против *S. aureus* ATCC 25923 (229).

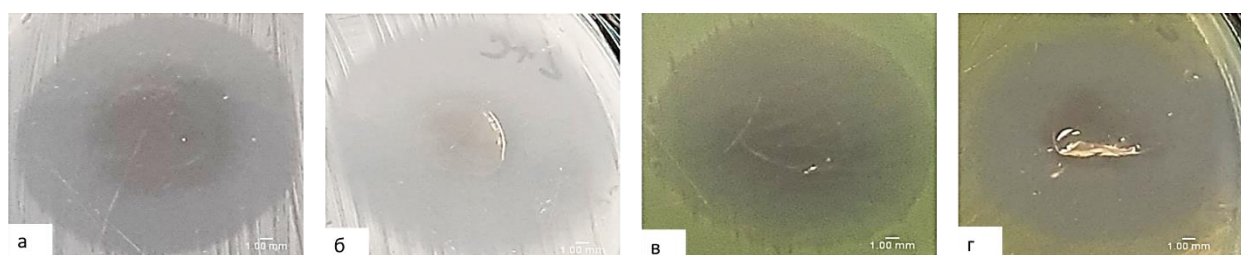
Табела 10. Резултати анализе пречника зона инхибиције испитиваних материјала методом–диск дифузије за тестиране бактеријске сојеве

Тестирани сој бактерија/ тестирани материјал	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Желатин	3.67±0.47*	2.00±1.41
Желатин/0.1% гентамицин	21.67±1.25	22.33±1.70
Филтер папир/гентамицин 1mg/mL	20.00±2.16	14.33±3.40
Желатин/0.1% ципрофлоксацин	28.00±3.74	18.33±4.11

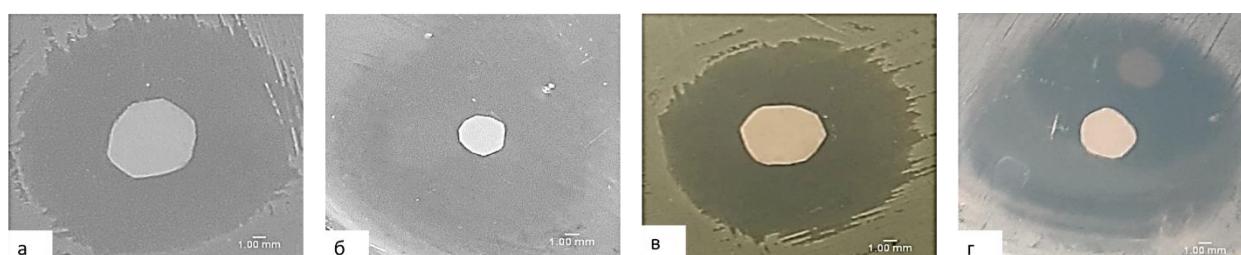
Филтер папир/ципрофлоксацин 1mg/mL	27.33±1.25	25.33±0.47
---------------------------------------	------------	------------

*Пречник зоне инхибиције је дат у mm без површине тестираног материјала

Деловање третмана узорака желатина на наведеним сојевима бактерија је приказано на **Сликама 46 и 47**. Ове слике детаљно илуструју различите зоне инхибиције раста *S. aureus*, омогућавајући визуелну анализу ефикасности скефолда у спречавању бактеријског раста. Слика 46 приказује антибактеријска својства скефолда, која су показали одређену способност инхибиције раста бактерија. Ови резултати су посебно значајни јер указују на природну антимикуробну активност желатина. Слика 47 приказује микрографије третмана филтер папира са импрегнираним антибиотицима.



Слика 46. Утицај третмана синтетисаних скефолда на а) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - желатин/0.1% гентамицин скефолд б) *S. aureus* ATCC 25923 - желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолд в) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - желатин/0.1% гентамицин скефолд и г) *P. aeruginosa* ATCC 27853- желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолд



Слика 47. Утицај третмана филтер папира са импрегнираним антибиотицима на: а) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – филтер папир/гентамицин 1mg/mL б) *S. aureus* ATCC 25923 – филтер папир/ципрофлоксацин 1mg/mL в) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – филтер папир/гентамицин 1mg/mL и г) *P. aeruginosa* ATCC 27853 - филтер папир/ципрофлоксацин 1mg/mL

Добијени резултати су показали да чисти узорци желатина, чак и без додатка антибиотика, поседују антимикуробна својства. Код бактеријских сојева *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), пречници зоне инхибиције износили су 3.67 ± 0.47 mm и 2 ± 1.41 mm. Ова антимикуробна активност може се објаснити интеракцијама између хемијских група желатина и бактеријских

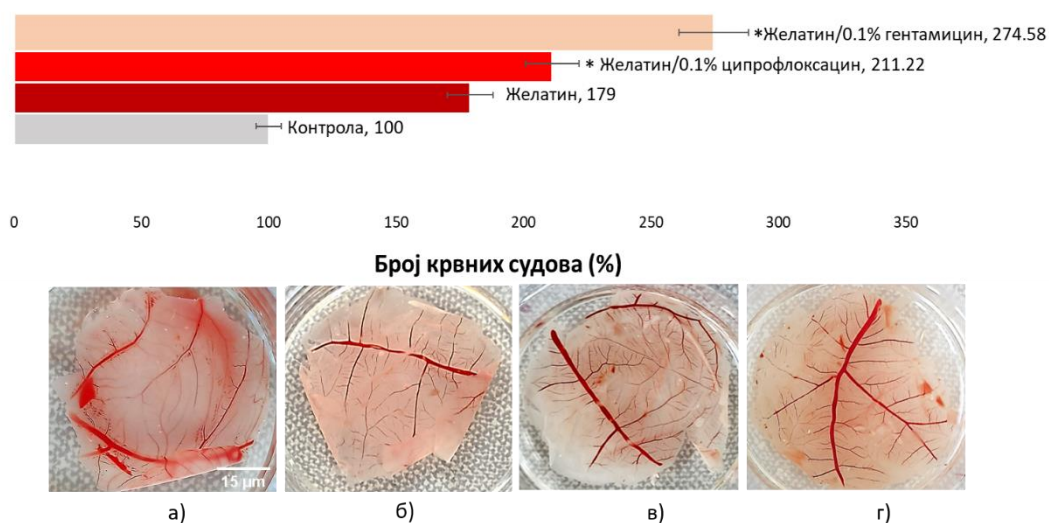
мембрана, као и спречавањем адхезије бактерија. Желатин/0.1% ципрофлоксацин и желатин/0.1% гентамицин скефолди показали су значајно боље антимикробне ефекте у поређењу са контролом (филтер папир са антибиотиком) и чистим желатином. Највећи пречник зоне инхибиције против *S. aureus* (ATCC 25923) је показао желатин/0.1% ципрофлоксацин (28 ± 3.74 mm), док је за *P. aeruginosa* (ATCC 27853) зона инхибиције била слична код оба скефолда са антибиотикима. Није примећена значајна разлика у ефикасности између желатин/0.1% ципрофлоксацина и желатин/0.1% гентамицина, иако је ципрофлоксацин показао нешто већу активност против *S. aureus*.

Резултати овог експеримента указују на супериорна антимикробна својства узорака желатина са антибиотикима, у односу на друге вештачке материјале. Истраживање једне студије је показало да синтетисана електроспинована влакна на бази хитозан/PVA су показала мањи пречник инхибиције против *S. aureus* (CMCC 26003) у поређењу са узорцима желатина без антибиотика. (147) Штавише, скефолди на бази хитозан/PVA/ципрофлоксацин са и без графен оксида, показали су зоне инхибиције од 16.2 ± 1.21 mm и 15.3 ± 1.08 mm, што је значајно ниже у поређењу са 28 ± 3.74 mm које је постигао узорак желатин/0.1% ципрофлоксацин против *S. aureus* (ATCC 25923). (307) Такође, узорци алгинат/PVA/желатин/ципрофлоксацин скефолда, показали су зоне инхибиције од 10.52 mm и 20.97 mm, што је такође мање ефикасно у поређењу са резултатима скефолда у овом истраживању. (307) Додавање антибиотика је значајно побољшало антимикробна својства скефолда, указујући на велики потенцијал природних полимера. Антибиотици у структури желатина додатно побољшавају ефикасност у борби против бактеријских инфекција, чиме се ови скефолди истичу као изузетни материјали за примену у побољшању процеса зарастања и превенцију инфекција.

4.2.8 *In vivo* тест хориоалантоичне мембране пилећег ембриона (CAM)

Ангиогени потенцијал вештачких биоматеријала представља један од кључних фактора у процесу зарастања рана, с обзиром на његову улогу у процесима неоваскуларизације, регенерацији ткива и убрзавању опоравка. (308) Формирање нових крвних судова у оштећеном ткиву омогућава боље снабдевање кисеоником и хранљивим материјама, омогућавајући на тај начин адекватан процес хомеостазе и одговарајући ћелијски метаболизам током зарастања. Утицај имплантираних скефолда на процес ангиогенезе је испитан помоћу САМ теста, који је коришћен за квантификацију густине крвних судова у третираном подручју.

Резултати теста су показали да ниједан од испитиваних типова скефолда није испољио токсичне ефекте, и да су тестирани скефолди показали способност индукције крвних судова у подручју имплантације, што додатно наглашава биоактивност желатина. Чисти узорци желатина значајно су повећали формирање крвних судова у поређењу са контролном групом, са повећањем од 179%. Овај ефекат се додатно појачао у присуству антибиотика, где су желатин/0.1% ципрофлоксацин и желатин/0.1% гентамицин скефолди показали значајно виши ангиогени потенцијал, са повећањем од 211.22% и 274.58% (**Слика 48**). Најизраженији ангиогени потенцијал је имао узорак желатин/0.1% гентамицин скефолда, који је индуковао највећи степен формирања крвних судова (274.58%).



Слика 48. Проценат новонасталих крвних судова у подручјима третираним скефолдима: а) контрола б) желатин в) желатин/0.1% ципрофлоксацин г) желатин/0.1% гентамицин. * Означава статистичку значајност у односу на контролу при $p < 0.05$

In vivo испитивања су потврдила значајан ангиогени потенцијал узорака желатина укључујући и оне са импрегнираним антибиотицима. Резултати су показали да имплантација скефолда доводи до значајног повећања густине крвних судова у поређењу са нетретираним контролним узорцима (Слика 48). Ово побољшање васкуларизације указује на способност скефолда желатина да подржи процес настајања и раста крвних судова. Као што је наведено горе у резултатима, желатин/0.1% ципрофлоксацин и желатин/0.1% гентамицин скефолди, показали су значајну стимулацију ангиогенезе са повећањем васкуларизације од 211.22% и 274.58% у поређењу са контролом (без третмана). Међу њима се истакао узорак желатин/0.1% гентамицин, који је показао највећи ангиогени одговор (274.58%), што указује на то да хемијска структура гентамицина и његова интеракција са матриksom желатина могу имати додатни стимулативни ефекат. Способност желатина да контролише ослобађање про- и антиинфламаторних цитокина омогућава уравнотежен инфламаторни одговор, што је кључно за регулацију процеса ангиогенезе. (309) Ово својство је посебно важно за процес зарастања рана, где инфламаторни одговор може спречити правилан развој васкуларизације. Поред тога, скефолди желатина олакшавају миграцију ендотелних прогениторних ћелија и других ангиогених ћелија до места ране, што директно покреће процес неоваскуларизације. (310) Присуство хемијских група, као што су амино ($-NH_2$) и карбоксилне ($-COOH$) групе, омогућава интеракцију са факторима раста и цитокинима, додатно побољшавајући ангиогене одговоре. (311)

На основу добијених резултата може се закључити да осим своје примарне антимикробне функције, одређени антибиотици могу позитивно утицати и на процес ангиогенезе, потенцијално кроз механизме инфламаторног одговора и смањења настајања инфекција. Ефикасна васкуларизација је од суштинског значаја за одрживост и функционалност ткивних имплантата, јер омогућава испоруку кисеоника, хранљивих материја и биолошких сигнала неопходних за ћелијску интеграцију у ткиво. (312) Захваљујући својој структури, скефолди желатина омогућавају и подстичу стварање нових крвних судова. Њихова висока биокompatibilност и биоразградивост пружају

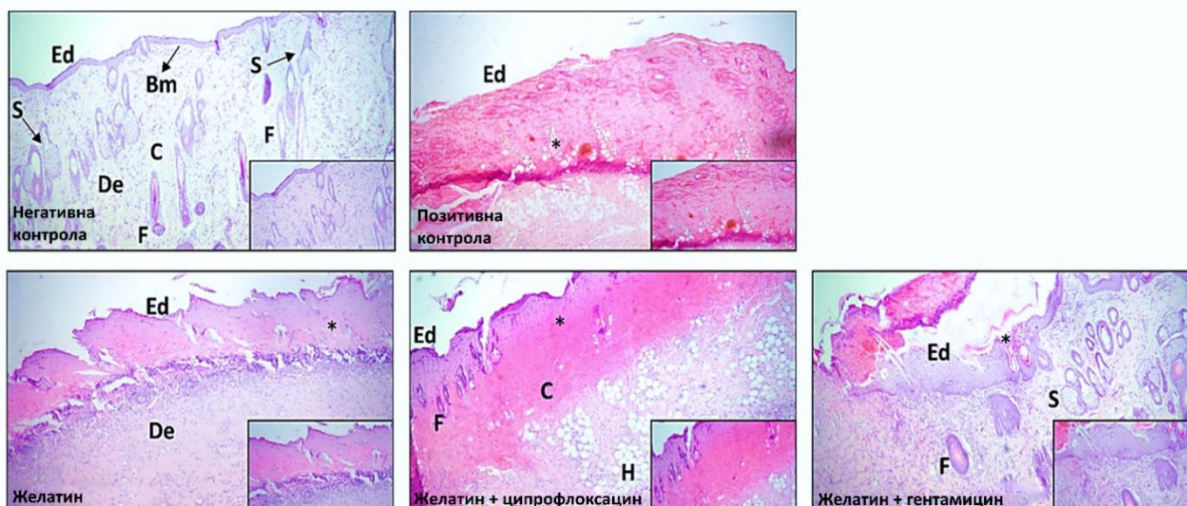
контролисано ослобађање антибиотских агенаса, док њихова хидрофилност и порозна структура олакшавају неометано одвијање биолошких процеса. Поред тога, желатин може да делује као резервоар за ангиогене факторе, чиме доприноси регулацији инфламаторног одговора и побољшању васкуларизације ткива. (313)

Према литератури, појачано стварање крвних судова у биоматеријалима често се постиже инкорпорацијом познатих ангиогених фактора раста у скефолде. (314) Кључну улогу у овом процесу имају молекули попут васкуларног ендотелног фактора раста (енгл. *VEGF* – *vascular endothelial growth factor*), фактора раста тромбоцита-BB (енгл. *PDGF-BB* – *platelet-derived growth factor-BB*) и базичног фактора раста фибробласта (енгл. *bFGF* – *basic fibroblast growth factor*), који стимулишу неоваскуларизацију подстицањем пролиферације и диференцијације ендотелних ћелија. (315) Међутим, иако се фактори раста често користе за подстицање процеса ангиогенезе, њихова примена је ограничена кратким полуживотом, брзом деградацијом у биолошком окружењу и потребом за контролом концентрације како би се избегли нежељени ефекти, попут прекомерног стварања крвних судова или дисрегулације инфламаторног одговора. (316) Оваква ограничења указују на потребу за другим методама, као што је коришћење материјала са нативним ангиогеним својствима.

Анализирани скефолди желатина, са и без додатка антибиотика, показују значајан ангиогени потенцијал, што их чини изузетно вредним за примену у ткивном инжењерингу и регенеративној медицини. Док су ангиогени фактори раста често коришћени за подстицање неоваскуларизације, природна својства желатина, укључујући његову интеракцију са ћелијама и способност контроле инфламаторног одговора, представљају обећавајућу алтернативу ангиогеним факторима.

4.2.9 Зарастање рана у *in vivo* условима

Да би се испитао утицај скефолда желатина, као и скефолда који садрже антибиотике, на процесе зарастања рана, спроведено је *in vivo* испитивање на моделу пацова са термичким оштећењем коже. Седам дана након индукције опекотина, анализирани су макроскопски и хистолошки параметри, укључујући процену регенеративних процеса у ткиву, степен епителизације и запаљенски одговор. Макроскопска анализа зарастања указала је на значајно побољшање у групи третираној скефолдом са антибиотиком у односу на позитивну контролу (нетретиране ране). Визуелни преглед је показао мању површину ране, смањено присуство фибринозног ексудата и бржу регенерацију епидермиса у третираној групи, што значи да скефолд може позитивно да утиче на процес зарастања путем контролисаног ослобађања антибиотика. Хистолошка анализа је додатно потврдила ове резултате. Сlike ткива здраве коже (негативна контрола), нетретираних (позитивна контрола) и третираних опекотина приказане су на **Слици 49**. У негативној контролној групи, очувана је нормална структура епидермиса, дермиса и хиподермиса, са добро организованим слојевитим сквамозним епителом и правилном дистрибуцијом колагених и еластичних влакана у дермису. Насупрот томе, у позитивној контролној групи примећен је некротични епидермис са значајним одвајањем од дермиса, као и интензивна инфилтрација неутрофила у гранулационом ткиву, што указује на хронични инфламаторни одговор и одложене процесе зарастања.



Слика 49. Резултати процеса зарастања рана након третмана скефолдима желатина у *in vivo* условима. А) Репрезентативне микрографије X&E бојења делова негативне и позитивне контроле, као и узорка третираних скефолдима са инкорпорираним ципрофлоксацином и гентамицином (оригинално увећање x10). Означено: Ed – епидермис, Bm – базална мембрана, De – дермис, F – фоликули длаке, S – лојна жлезда, C – колагена влакна, H – хиподермис, * – област опекотине

У третираним групама, присуство електроспинованих скефолда значајно је утицало на регенеративне процесе. У узорцима третираним скефолдом са антибиотицима, забележен је побољшани степен епителизације, са редукованим инфламаторним инфилтратом и већом густином новоформираних крвних судова у односу на позитивну контролу. Ови резултати указују на синергистички ефекат желатина и антибиотика у подстицању ангиогенезе, смањењу бактеријске контаминације и убрзавању процеса зарастања. Хистопатолошки налази су показали значајно унапређен процес регенерације и ремоделирања ткива у свим третираним групама у поређењу са позитивном контролном групом, што указује на позитивне ефекте примењених скефолда. Као што се и очекивало, група са узорцима чистог желатина без антибиотика показала је спорији процес зарастања, што је потврђено присуством изражених инфламаторних жаришта, као и слабијим таложењем и организацијом екстрацелуларног матрикса у односу на скефолде који садрже антибиотик (Слика 49). Ово указује на ограничену антимикробну заштиту и недовољну контролу инфламаторног одговора у овој групи, што је могло довести до продужене фазе упале са отежаним преласком у фазу регенерације. Са друге стране, најизраженије зарастање примећено је у групи третираној желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолдом. Хистолошка анализа овог узорка открила је побољшану организацију и сазревање епидермалних слојева, укључујући повећано рожњачење *stratum corneum*, што указује на бољи процес епителизације. Поред тога, примећено је значајно смањење броја инфламаторних ћелија у односу на друге групе, што представља ефикаснију контролу инфламаторног одговора и бржи прелазак у фазу ткивне регенерације. Такође, битно је споменути процес организације колагених влакана у дермису. Код групе са ципрофлоксацином, колагена мрежа је била компактније распоређена, са уреднијом структуром и већим присуством зрих колагених влакана, са бољим знацима ремоделирања ткива. (317) Ово је од кључног значаја за формирање ожиљка и враћање механичке отпорности коже. Поред тога, у овој групи је примећен значајно већи степен

ангиогенезе, што је потврђено насталим новоформираним крвним судовима. Ово је важно, јер је адекватна васкуларизација неопходна за снабдевање кисеоником и хранљивим материјама које су неопходне за успешну регенерацију ткива. Побољшана ангиогенеза може бити последица контролисаног ослобађања ципрофлоксацина, који је не само инхибирао бактеријске инфекције, већ и утицао на ћелијске сигналне путеве укључене у процес регенерације.

Ови резултати указују на то да комбинација антибактеријских својстава и биомиметичке структуре скефолда желатина доприноси стварању оптималног окружења за регенерацију. Желатин као биополимер обезбеђује матрикс који подстиче адхезију и пролиферацију ћелија, док ципрофлоксацин спречава развој бактеријских инфекција, које би могле довести до продужења инфламаторне фазе и одложеног зарастања. (317)

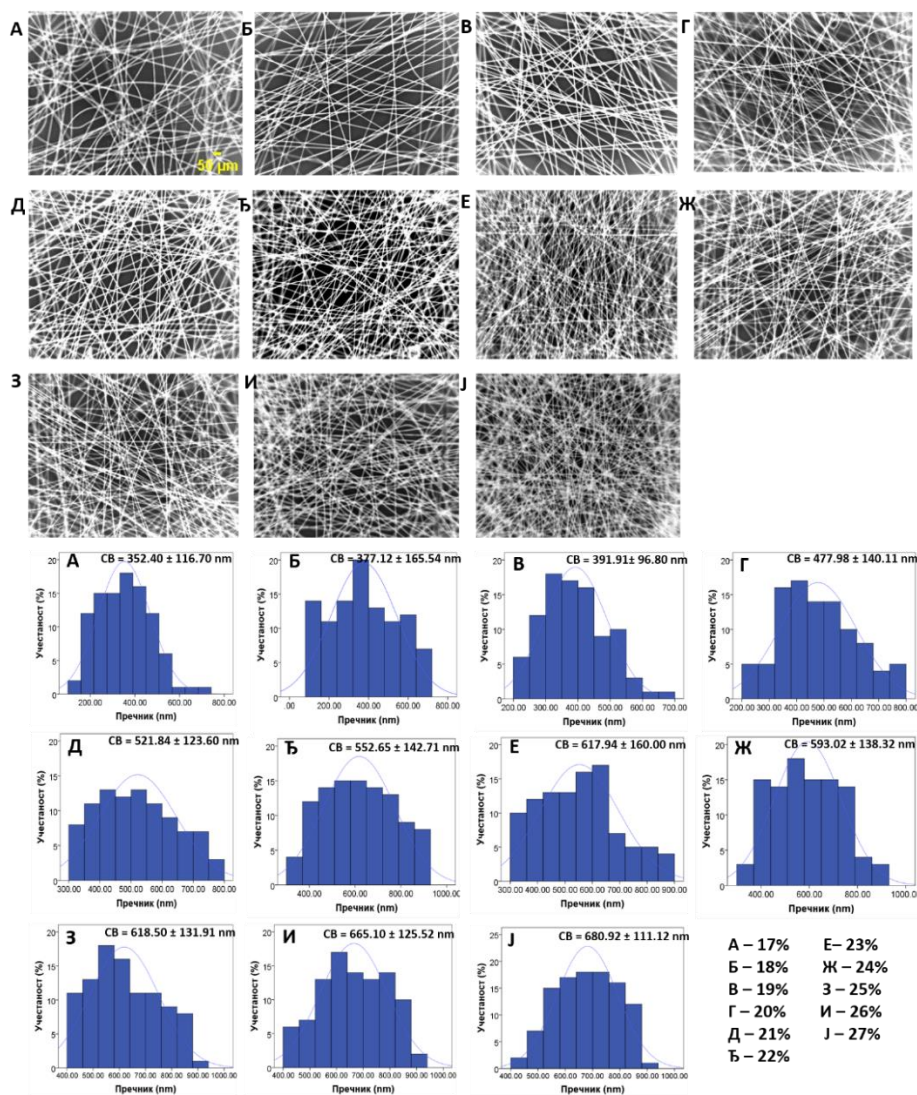
Резултати овог експеримента су у складу са ранијим истраживањима која су анализирали улогу антибиотика у процесу зарастања рана. На пример, влакна на бази хитозана/PEO/SiO₂ са уграђеним ципрофлоксацином значајно су убрзала процес зарастања рана код пацова у поређењу са скефолдима без антибиотика. (318) Друга студија је показала да је инкорпорација ципрофлоксацина у хибридне полиуретанске (PU) скефолде довела до повећане пролиферације васкуларних ендотелних ћелија око ране. Овај ефекат је стимулисао формирање нових крвних судова, убрзавајући процес зарастања. (319) Скефолди желатина, због своје биомиметичке структуре, нуде идеално микроокружење за активирање интрацелуларних сигналних путева који су одговорни за регенерацију ткива. Додавање антибиотика у скефолде желатина поседује двоструки ефекат, побољшава структуру скефолда кроз интеракцију антибиотика са желатином, и помаже у зарастању рана својим антибактеријским својствима. Хистолошка анализа је показала значајну разлику у таложењу колагена и упалном одговору између група третираних скефолдима са ципрофлоксацином и гентамицином. Обе групе су показале ангиогене и регенеративне способности, али су желатин/0.1% ципрофлоксацин скефолди постигли бољи ефекат у смањењу инфламације и стимулацији синтезе колагена.

Ово је прва студија која анализира потенцијал влакана желатина након умрежавања са глутаралдехидом уз импрегниране антибиотике у испитивању процеса неоангиогенезе и зарастања рана. Резултати овог истраживања показују значајну улогу синтетисаних материјала у регенеративној медицини, посебно у лечењу рана. Даљи рад на оптимизацији концентрације антибиотика и структурних модификација скефолда желатина може додатно побољшати њихов потенцијал, што ће заузврат пружити обећавајуће кандидате за примену у ткивном инжењерингу.

4.3 Део 3. Полисахариди

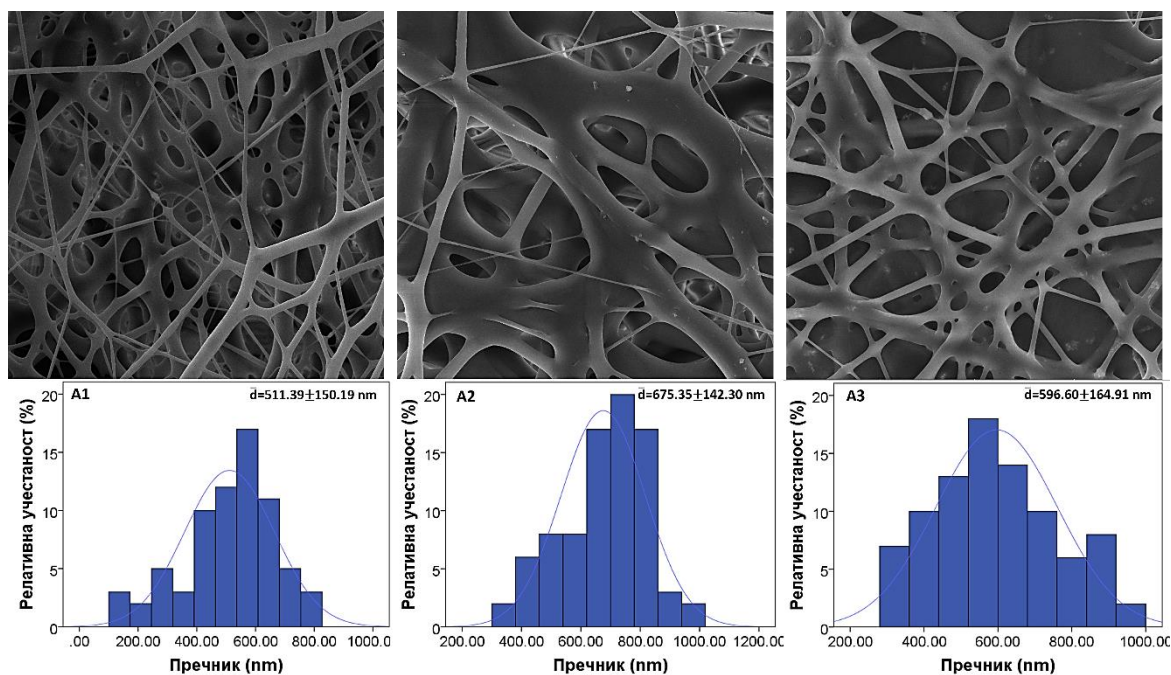
4.3.1 Морфолошка карактеризација влакана хитозана

Током експерименталног рада, припремљено је укупно 65 различитих комбинација хитозан/PLA раствора, у којима су концентрације појединачних компоненти варирале у различитим опсезима. Опсег концентрација за хитозан је износио од 0.01 до 0.05% (w/v), док је за PLA опсег износио 15–27% (w/v). Као растварач за хитозан је била коришћена 90% сирћетна киселини (AcA), а за PLA хлороформ (CHCl_3). Најбоље перформансе у формирању нановлакна и даљим испитивањима показао је раствор припремљен мешањем 22% PLA раствореног у CHCl_3 и 0.02% хитозана раствореног у 90% AcA у запреминском односу 1:1. Ова комбинација је омогућила формирање влакана са уједначеном морфологијом, без значајне појаве капљица или солидификованих структура. Као и код претходно испитиваних скефолда, са циљем побољшања потенцијалних регенеративних и антибактеријских својстава, раствори антибиотика ципрофлоксацина и гентамицина у концентрацији од 1 mg/mL су додати у хитозан/PLA раствор. Добијени скефолди су анализирани помоћу оптичке микроскопије са циљем испитивања иницијалне расподеле структуре влакана као и њихових пречника, а детаљније морфолошке карактеристике су испитане помоћу SEM анализе. Пречници влакана су мерени коришћењем софтвера ImageJ, као што је рађено и за претходне узорке. Микрографије добијених влакана и дистрибуција пречника влакана су приказане на **Слици 50**.



Слика 50. Микрографије влакана хитозана/PLA добијене помоћу оптичког микроскопа и дистрибуција пречника влакана у зависности од концентрације раствора

Оптичком анализом су уочена уједначена влакна хитозан/PLA узорака без дефеката, са континуираном расподелом и глатком површином. Детаљнија анализа SEM методе је показала равне, насумичне оријентације влакана, без присуства перли и других дефеката (Слика 51).



Слика 51. SEM слике и дистрибуција пречника влакана: A1- хитозан/PLA нановлакна без антибиотика, A2 – хитозан/PLA/0.1% гентамицин, A3 – хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин

На основу резултата SEM анализе уочене су незначајне морфолошке варијације у структури влакана хитозан/PLA скефолда у зависности од примењених антибиотских агенаса. Хистограми дистрибуције пречника влакана за испитиване узорке хитозан/PLA представљају визуелни приказ расподеле пречника (Слика 51). Средња вредност пречника влакана за узорак чистог хитозан/PLA је износила 511.39 ± 150.19 nm. Оваква расподела указује на релативно уједначену структуру влакана, али са променама у пречнику које могу бити последица нестабилности млаза током процеса електроспиновања.

У поређењу са узорцима који садрже антибиотике, узорак чистог хитозана показује најмању вредност пречника влакана, што указује на чвршћу структуру влакана у одсуству додатих агенаса. Додавање антибиотика, нарочито гентамицина, довело је до промена у морфологији влакана. Средња вредност пречника влакана у узорку хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин је била 675.35 ± 142.30 nm, што представља благо повећање у односу на узорак без антибиотика. Повећање вредности пречника влакана се може објаснити као последица интеракција између хитозана и ципрофлоксацина, стварањем водоничних веза које доводе до реорганизације молекулских структура, и на тај начин утичу на физичка својства и доводе до формирања дебљих влакана. (320)

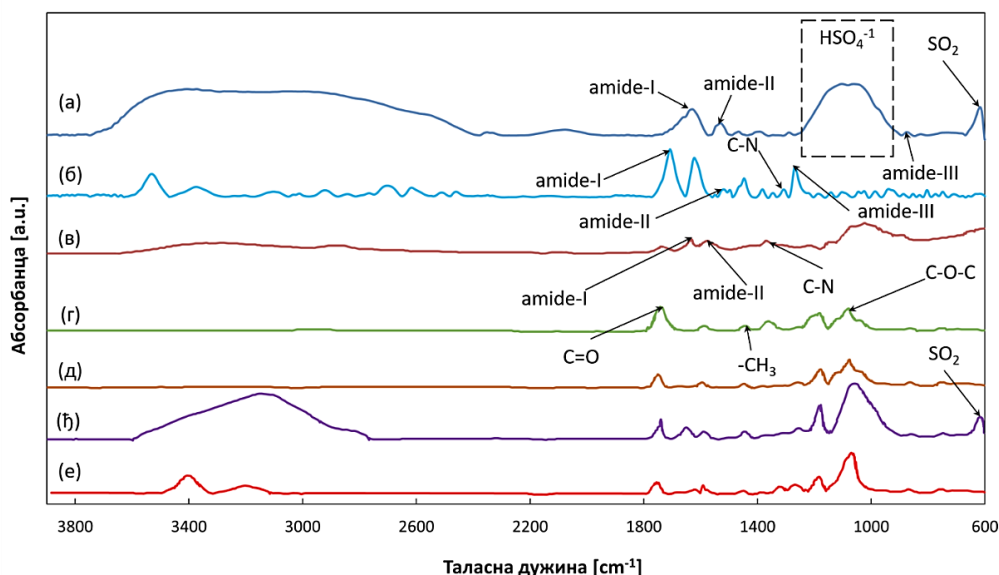
Код узорка хитозан/PLA/0.1% гентамицин скефолда средња вредност пречника влакана је износила 596.60 ± 164.91 nm, што је веће у односу на чист хитозан, али мање у односу на хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин узорак. Такав резултат говори о различитим ефектима које различити антибиотски агенси имају на морфологију влакана. Дистрибуција пречника у узорку са гентамицином показује шири опсег вредности, што значи да је овај антибиотик мање утицао на структуру влакана у поређењу са ципрофлоксацином. Ова разлика може бити последица различитих механизма деловања и интеракција између антибиотика и хитозан/PLA матрикса.

Литературни подаци потврђују овакав тренд, где се након импрегнације антибиотским агенсима уочава значајно повећање вредности пречника влакана. (321) Један од могућих разлога за ову појаву је промена вискозности раствора након додавања антибиотика, као и смањење проводљивости раствора, посебно када се дода у водени раствор антибиотика. Антибиотски агенси који нису соли или полиелектролити, као што је случај са ципрофлоксацином и гентамицином, могу мењати физичко-хемијске особине раствора и интеракције са молекулима полимера, што доводи до промена у структури добијених влакана. (322), (323)

Испитивани узорци влакана који садрже антибиотске агенсе показују већу средњу вредност пречника влакана у поређењу са чистим узорком. Узорак са ципрофлоксацином показује највеће повећање пречника. Додавање ципрофлоксацина доводи до структурних промена у хитозан/PLA скефолду у односу са узорком који садржи гентамицин. Овакве разлике могу бити последица различитих врста интеракција које антибиотици остварују са полимерима. Специфичне молекулске и физико-хемијске интеракције између антибиотика и полимера могу утицати на структуру влакана, укључујући и повећање вредности њиховог пречника.

4.3.2 FTIR анализа

Спектри добијени за хитозан/PLA влакана и за хитозан/PLA са импрегнираним антибиотцима—гентамицином и ципрофлоксацином, анализирани су како би се истражиле промене у структури полимера након додатка антибиотика. Поред ових спектра, приказани су и спектри појединачних компонената, као што су чист хитозан, PLA, гентамицин и ципрофлоксацин. Добијени FTIR спектри су представљени на **Слици 52**.



Слика 52. FTIR спектри прашкастог агенса гентамицин сулфата (а), ципрофлоксацин хидрохлорида (б) хитозана (в) PLA (г) хитозан/PLA (д) хитозан/PLA/0.1% гентамицин (ђ), и е) хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин влакана

Код FTIR спектра анализираних PLA влакана, доминантни пикови се јављају на 1730 cm^{-1} и 1085 cm^{-1} и повезани су са карбонилном групом ($\text{C}=\text{O}$) и основном естарском

групом (C-O-C), што је карактеристично за структуру PLA полимера. Пик на 1730 cm^{-1} је посебно значајан, јер указује на присуство C=O групе која игра кључну улогу у структури PLA и његовим својствима. За хитозан, снимљени спектар показује карактеристичне пикове на 1610 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} и 1359 cm^{-1} , који одговарају амидним везама: примарној (амид-I), секундарној (амид-II) и терцијарној амидној (амид-III) вези. Добијање карактеристичних спектроскопских пикова је од суштинског значаја за идентификацију хитозана, јер присуство одређених функционалних група таквих као што су амидне и хидроксилне, су одговорне за његова биолошка и хемијска својства. Присуство и просторни распоред ових група може значајно утицати на интеракцију хитозана са другим полимерима или биоактивним молекулима унутар скефолда. Такве интеракције могу променити физичко-хемијска својства скефолда, па детаљна анализа пикова омогућава потврду хемијског састава, структуре одређене компоненте, и такође пружа увид у потенцијалну функционалност скефолда.

Код прашкастих супстанци, конкретно у случају чистог гентамицина, FTIR спектар показује пикове на 1630 cm^{-1} , 1533 cm^{-1} и 1247 cm^{-1} , који су везани за амид-I, амид-II и амид-III везе. Пик на 1062 cm^{-1} потврђује присуство HSO_4^- групе, док пик на 617 cm^{-1} указује на присуство SO_2 групе. (298) Слично томе, добијени пикови код испитиваног ципрофлоксацина су били детектовани на 1623 cm^{-1} , 1519 cm^{-1} и 1269 cm^{-1} , који одговарају амид-I, амид-II и амид-III везама ципрофлоксацина. Пик на 1281 cm^{-1} је специфичан за ципрофлоксацин, као резултат присуства C-H везе. (299)

Кад су у питању PLA/хитозан влакна, добијени спектар показује сигнале који су карактеристични за обе компоненте. Међутим, примећени су и благи помаци амидних и C-O-C опсега, што указује на интеракцију између хитозана и PLA. До помака пикова у спектру долази због промене конформације функционалних група, што за последицу има промене у молекулској структури полимерне матрице. Све то указује на присуство међумолекулских интеракција, које могу утицати на стабилност и структуру скефолда.

У случају хитозан/PLA/0.1% гентамицин узорка, FTIR спектар показује карактеристичне пикове присутне и код хитозан/PLA узорка, али и додатне пикове који потврђују присуство гентамицина. Најзначајније промене укључују проширење амидних опсега и појаву новог пика на 1043 cm^{-1} , што указује на интеракцију између аминских група гентамицина и хидроксилних/амидних група хитозана.

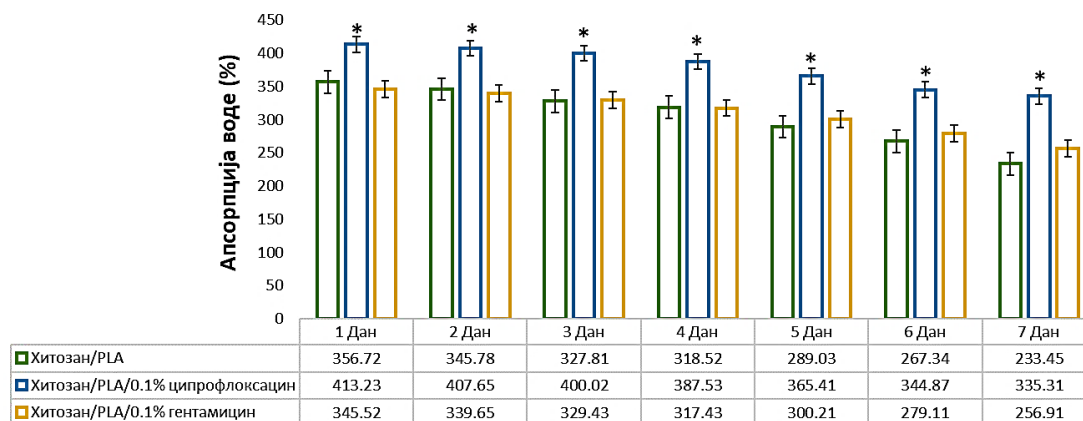
Слично томе, у спектру хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин узорка, потврђени су карактеристични пикови за хитозан и PLA, али и додатни пикови који потврђују инкорпорирање ципрофлоксацина. Померање карактеристичног опсега C-N везе на 1359 cm^{-1} , као и померања у карбоонилним опсезима на 1730 cm^{-1} , приказују специфичне интеракције између ципрофлоксацина и хитозана, вероватно због формирања водоничних веза.

Занимљиво је напоменути да у случају крослинкованих скефолда желатина, упркос присуству антибиотика унутар полимерног скефолда, FTIR анализа није показала карактеристичне пикове који би указивали на њихово присуство. Ова појава се може приписати преклапању специфичних пикова антибиотика са функционалним групама других компоненти, као и у могућој интеракцији антибиотика са агенсом глутаралдехидом, што може довести до њихове маскираности у FTIR спектру. Са друге стране, у узорку хитозан/PLA, присуство антибиотика је спектроскопски детектовано, што значи да не долази до преклапања функционалних група испитиваних компонената. Резултати FTIR анализе указују на успешну импрегнацију антибиотика у хитозан/PLA влакнима. Такође, постојање интеракција између компоненти, као што су водоничне везе и помаци амидних и C-O-C опсега, играју кључну улогу у дефинисању стабилне структуре добијених влакана.

4.3.3 Испитивање степена апсорпције и деградације

Апсорпција

На основу добијеног дијаграма (Слика 53), примећене су разлике у степену апсорпције воде код узорка хитозан/PLA, хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин и хитозан/PLA/0.1% гентамицин скефолда током испитиваног временског периода.



Слика 53. Дијаграм апсорпције воде узорка хитозан/PLA, хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацина и хитозан/PLA/0.1% гентамицина влакана током 7 дана инкубације у PBS-у (pH = 7.4, 37 °C). Подаци су приказани као средња вредност $\pm$ SD за дупле експерименте. * Представља статистичку значајност од желатин/0.1% гентамицин узорка, $p < 0.05$

Узорак хитозан/PLA без антибиотика показао је нижи степен апсорпције воде у односу на узорке са инкорпорираним антибиотикима (хитозан/PLA = 233.45%, хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин = 335.31%, и хитозан/PLA/0.1% гентамицин = 256.91% након седмог дана). Из ових резултата се може закључити да присуство антибиотика повећава хидрофилност хитозан/PLA скефолда и доводи до повећане апсорпције воде. Статистички значајна разлика уочена је код хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин узорка, који показује већи степен апсорпције воде у поређењу са хитозан/PLA и хитозан/PLA/0.1% гентамицин узорцима, што може указивати на то да ципрофлоксацин појачава хидрофилне особине и можда мења структуру хитозан/PLA скефолда, омогућавајући бољи контакт са водом.

Уочене разлике између хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин и хитозан/PLA/0.1% гентамицин влакана указују на то да ципрофлоксацин има израженији утицај на повећање апсорпције воде. Хемијска структура ципрофлоксацина садржи карбоксилне (COOH) и карбонилне (C=O) групе, као и атом флуора (F), који могу да реагују са молекулима воде формирајући водоничне везе, повећавајући хидрофилност скефолда и самим тиме омогућавајући већу апсорпцију.

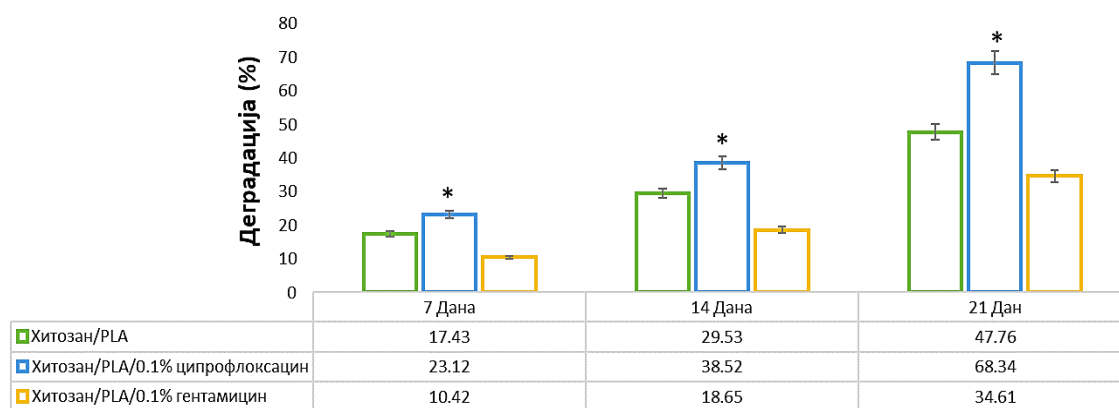
Када је реч о гентамицину, он се везује јонским интеракцијама са хитозаном (јер хитозан поседује амино (NH₂) групе у својој структури), што може смањити број слободних места за везивање воде, чиме се смањује способност скефолда да апсорбује воду. Поред тога, временски фактор има значајан утицај на апсорпцију воде код свих испитиваних узорка. Степен апсорпције воде опада током времена, што је

највероватније резултат структурних и физичких промена у скефолду, као што је могуће засићење капацитета за апсорпцију воде. Након 1. и 2. дана, сви узорци показују највећи степен апсорпције, с тим да је узорак са ципрофлоксацином показао највећи степен апсорпције (хитозан/PLA=356.72%, хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин=413.23%, хитозан/PLA/0.1% гентамицин=345.52%). Како време одмиче, капацитет апсорпције код свих узорака опада, што је посебно изражено код узорака са антибиотикима. Након 7. дана, сви узорци показују ниже вредности апсорпције, при чему хитозан/PLA показује најнижи ниво (233.45%), док узорци са антибиотикима имају нешто виши степен апсорпције, али и даље показују тренд опадања.

Резултати показују да додавање антибиотика значајно утиче на способност апсорпције воде код хитозан/PLA скефолда. Посебно се истиче хитозан/PLA узорак са инкорпорираним ципрофлоксацином, који показује највеће вредности апсорпције воде. Присуство антибиотика повећава хидрофилност хитозан/PLA скефолда, што је директна последица интеракција између поларних група антибиотика и структуре скефолда. (134) Смањење капацитета апсорпције воде током времена је примећено код свих испитиваних узорака, и на тај начин показује промене у хидрофилности у зависности од времена. Као што је примећено и код скефолда желатина, разлике у хемијској структури и поларитету антибиотика утичу на њихову интеракцију са матриksom полимера. Ципрофлоксацин, са израженим хидрофилним карактеристикама, додатно повећава капацитет апсорпције воде у поређењу са гентамицином, који има мање значајан ефекат на хидрофилност узорка.

Деградација

Уз степен апсорпције воде, одрађен је и степен деградације како би се испитала деградабилност хитозан/PLA и хитозан/PLA влакана са инкорпорираним антибиотикима. На основу дијаграма (Слика 54), који приказује проценат деградације током 21-дневног периода, уочен је различит степен деградације чистог хитозан/PLA и хитозан/PLA са инкорпорираним антибиотикима.



Слика 54. Профил деградације хитозан/PLA, хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин и хитозан/PLA/0.1% гентамицин нановлакна током 21 дана инкубације у PBS-у (pH =7.4, 37 °C). Подаци су приказани као средња вредност $\pm$ SD за дупле експерименте. *Представља статистичку значајност у односу на желатин/0.1% гентамицин, $p < 0.05$

Хитозан/PLA узорак без антибиотика показао је спорију стопу деградације током испитивања. Након 7. дана, забележен је резултат деградације од 17.43%, што указује на постепени почетак разградње. Деградација након 14. дана је износила 29.53%, а након 21. дана се повећала на 47.76%. Овако умерен процес деградације указује на стабилност хитозан/PLA узорка током целог испитивања.

Узорак хитозан/PLA са додатком ципрофлоксацина показао је значајно бржу стопу деградације у односу на остале. Након 7 дана, деградација је износила 23.12%, док је након 14 и 21 дана порасла на 38.52% и 68.34%. Ови резултати указују на већи степен деградације у поређењу са чистим хитозан/PLA узорком и хитозан/PLA/0.1% гентамицин узорком.

Супротно томе, хитозан/PLA са додатком гентамицина показао је најспорију деградацију међу свим тестираним узорцима. Деградација након 7 дана била је 10.42%, што је ниже у односу на узорак са ципрофлоксацином и нешто ниже од чистог хитозан/PLA узорка. До 14 дана је стопа деградације постепено порасла до 18.65%, а након 21 дана је достигла 34.61%, што представља најнижу вредност међу испитиваним узорцима (Слика 54).

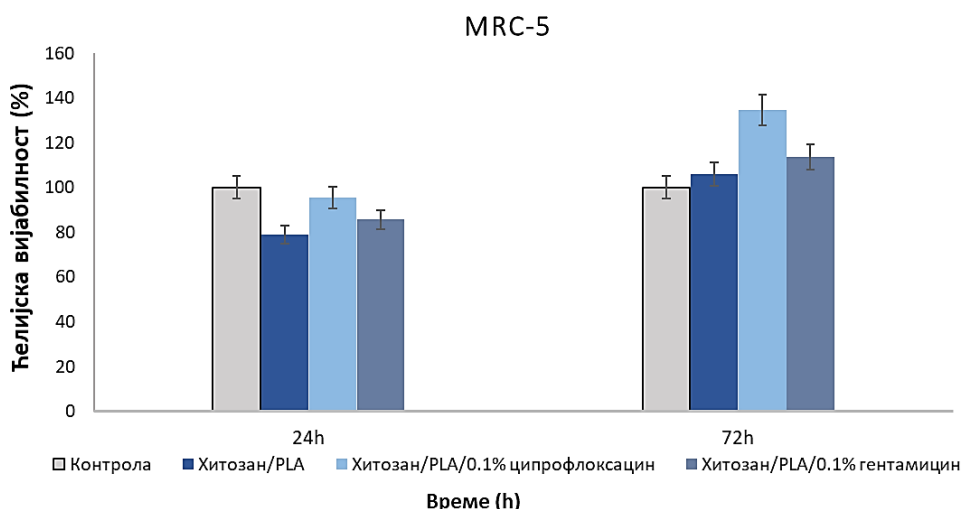
Темпо деградације хитозан/PLA узорака такође зависи од присуства и типа антибиотика. Хитозан/PLA са ципрофлоксацином је показао најбржу деградацију. Ципрофлоксацин, због своје хемијске структуре и присуства поларних група, остварује формирање водоничних веза са матриксом хитозан/PLA, што доводи до повећане хидрофилности. Према литературним подацима, повећана хидрофилност убрзава хидролизу и разградњу скефолда, и доводи до убрзаног отпуштања антибиотика. (324), (325) Супротно томе, гентамицин има мањи утицај на структуру и хидрофилност, и води ка успоренијој деградацији скефолда и постепеном отпуштању активне супстанце. Хитозан/PLA без антибиотика показује умерен темпо деградације, обезбеђујући равнотежу између структурне стабилности и деградације. Овако синтетисани скефолд омогућава структурну стабилност током дужег периода, што га чини погодним за дуготрајне третмане хроничних инфекција. (326) Са друге стране, повећана хидрофилност и бржа деградација хитозан/PLA скефолда са ципрофлоксацином чини га погодним за примену у акутним стањима, где је потребно брзо ослобађање активних компоненти. Насупрот томе, спорија деградација хитозан/PLA скефолда са гентамицином омогућава његову употребу у стањима где се захтева спорија деградација материјала и постепено отпуштање активне супстанце. Такође, као што је већ показано у литератури, присуство хидрофилних полимера као што је хитозан, може додатно убрзати хидролизу PLA полимера. (327)

На основу добијених резултата и спроведене статистичке анализе, може се рећи да постоје статистички значајне разлике у резултатима степена деградације између хитозан/PLA и хитозан/PLA узорака са инкорпорираним антибиотским агенсима. Добијене разлике у резултатима указује да присуство ципрофлоксацина и гентамицина има различите ефекте на деградабилност материјала, и самим тиме мења структурне особине самог материјала. Имајући то у виду, оптимизација и прилагођавање својстава у зависности од поља примене је врло битна ставка код синтезе влакана.

4.3.4 Испитивање цитотоксичности и вијабилности

Цитотоксичност третмана процењује се на основу његовог утицаја на вијабилност ћелија. Добијени резултати су представљени на Слици 55 која приказује ћелијску вијабилност MRC-5 ћелијске линије након третмана са узорцима хитозан/PLA и хитозан/PLA са инкорпорираним антибиотцима. Трајање третмана је изведено у два

временска интервала, 24 и 72 сата, што омогућава анализу краткорочног и дугорочног ефекта узорак на ћелијску вијабилност.



Слика 55. Тест цитотоксичности на MRC-5 ћелијској линији услед третмана хитозан/PLA, хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацина и хитозан/PLA/0.1% гентамицина влакана након 24 и 72 сата

Анализом чистог узорка хитозан/PLA без додатка антибиотика, примећено је одређено смањење ћелијске вијабилности у поређењу са контролном групом. Након 24 сата, вијабилност је износила 78.24%, што је статистички незначајно у односу на контролну групу. Ово смањење може бити последица физичко-хемијских особина скефолда, која могу утицати на интегритет ћелијске мембране или на пролиферацију ћелија. (328) Међутим, након 72 сата, вијабилност је достигла 105.98%, и то може значити да се ћелије највероватније адаптирају на присуство скефолда или да у току процеса деградације скефолда хитозан/PLA не ослобађа цитотоксичне компоненте. (329)

У случају са хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин узорком, резултати вијабилности након 24 сата су износили 95.43%. Након 72 сата, ћелијска стабилност се повећавала и достигла вредност 134.56%. Резултати вијабилности хитозан/PLA/0.1% гентамицин скефолда су износили 85.65% након 24 и 113.47% након 72 сата. Овакав резултат указује да хитозан/PLA/0.1% гентамицин узорак има нешто мањи утицај на брзину пролиферације и вијабилности ћелија у односу на хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин, док у поређењу са чистим хитозан/PLA узорком ипак показује боље резултате.

Добијени резултати потврђују да присуство антибиотика повећава вијабилност према MRC-5 ћелијама, при чему је ципрофлоксацин имао израженији ефекат у поређењу са гентамицином. Ова разлика може бити последица фармаколошких особина антибиотика, као и њихове способности да утичу на ћелијске мембране и унутрашње међућелијске процесе. (330)

Ципрофлоксацин, као синтетички флуорохинолон, делује тако што инхибира бактеријску ДНК репликацију, чиме смањује присуство бактерија и ствара повољније услове за ћелијске процесе. (331) С друге стране, гентамицин, који припада групи аминогликозидних антибиотика, углавном делује на бактеријске рибозоме, али његова хемијска структура омогућава мање интеракција са ћелијским мембранама MRC-5 ћелија, што има за последицу смањено деловање на ћелијску вијабилност. (332)

Комбинација хитозана са PLA омогућава формирање порозне, хидрофилне структуре влакана која подржава адхезију и раст ћелија. Хитозан је познат по својој биокомпатибилности, док PLA се посебно издваја због својих изузетно уравнотежених својстава која подсећају на структуру ванћелијског матрикса. Према резултатима објављених студија, комбинација хидрофобног PLA и поларног хитозана се показала као изузетно погодна матрица за неометан процес ћелијске адхезије и пролиферације. (333), (334), (335) Још једна студија је показала да захваљујући хидрофобној природи PLA, није уочено испољавање цитотоксичних ефеката на фибробластима људске коже. (336), (337), (338)

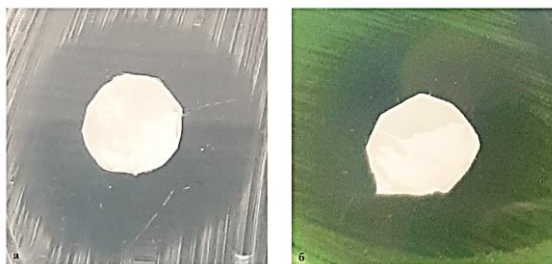
Добијени резултати су у складу са ранијим истраживањима која указују да тип антибиотика, који се инкорпорира у скефолд, може значајно утицати на цитотоксичност. (339), (340) Посебно је важно нагласити да је правилно одређивање концентрације антибиотика од кључне важности за постизање баланса између антимикробне и активности и очувања биокомпатибилности. (341), (342), (343)

4.3.5 Анализа антибактеријске активности

Антимикробна активност хитозан/PLA узорака влакана са антибиотским агенсима као што су гентамицин и ципрофлоксацин, анализирана је користећи диск дифузиону методу, која представља стандардну и широко прихваћену технику за испитивање осетљивости микроорганизама на антибиотике. У овом истраживању, коришћени су два различита соја бактерија: грам-позитивна *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и грам-негативна *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), који су изабрани због своје клиничке значајности и разлика у њиховим патогеним својствима и механизмима отпорности на антибиотике. Добијени резултати експеримента показују да узорци који су импрегнирани антибиотским агенсима, показују одређени степен антимикробне активности (Слика 56, 57).



Слика 56. Пример антимикробног деловања хитозан/PLA/0.1% гентамицин влакана на:
а) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 б) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Слика 57. Пример антимикробног деловања хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин влакана на: а) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 б) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Међутим, ова активност није достигла ниво који би био упоредив са деловањем стандардних антибиотских дискова, што указује да је ефикасност материјала са антибиотским агенсима ограничена (**Табела 11**). Пречник зоне инхибиције раста бактерија, као главни параметар за процену антимикробне активности, био је мањи у односу на стандардне антибиотске дискове, што може указивати на слабији антимикробни ефекат. Важно је напоменути да ниједан од тестираних узорака није показао резултате који су у рангу деловања позитивне контроле. Ово указује на то да антимикробни ефекат који хитозан/PLA скефолди пружају није довољан да потпуно сузбије раст бактерија, барем у условима у којима је изведен тест. Уколико је зона инхибиције мала или на граници детекције, то указује на ослабљену способност материјала да инхибира раст бактерија (229).

Табела 11. Пречник инхибиције раста тестираних материјала

Тестиране бактерије / Тестирани материјал	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Хитозан	-	-
Хитозан/0.1% гентамицин	15.67±1.25*	13.00±2.83
Филтер папир/гентамицин 1mg/mL	20±2.16	14.33±3.40
Хитозан/0.1% ципрофлоксацин	19.67±2.50	20.33±0.94
Филтер папир/ципрофлоксацин 1mg/mL	27.33±1.25	25.33±0.47

- нема деловања;

* Пречник зоне инхибиције је дат у mm без површине испитиваног материјала

На основу добијених резултата је уочљиво да хитозан/PLA узорак не показује антимикробне особине на тестираним бактеријским сојевима *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Ово је важан резултат, јер указује на потребу за додатним третманима или комбинацијама са антибиотцима како би се побољшао антимикробни ефекат скефолда. На основу овог, може се закључити да сам хитозан/PLA није довољан за спречавање раста бактерија, што значи да је потребна модификација структуре синтетисаног скефолда како би се постигао значајнији антимикробни ефекат.

Када је у питању хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин узорак, добијени резултати показују да овај узорак показује одређени степен антимикробне активности. Пречник зоне инхибиције износи 19.67±2.50 mm за *S. aureus* и 20.33±0.94 mm за *P. aeruginosa*. Ова величина зоне инхибиције указује на то да ципрофлоксацин, као липосолубилни антибиотик, показује добру способност за дистрибуцију на површини влакана. Липофилност ципрофлоксацина омогућава његово лакше везивање за структуру

полимерне матрице, што доводи до бржег ослобађања и самим тиме до интензивније антибактеријске активности. (344)

У поређењу са ципрофлоксацином, резултати за хитозан/PLA/0.1% гентамицин узорак показују нешто мање зоне инхибиције: 15.67 ± 1.25 mm за *S. aureus* и 13.00 ± 2.83 mm за *P. aeruginosa*. Иако су ове зоне инхибиције мање, разлика између филтер папира са антибиотикима и хитозан/PLA узорака који садрже антибиотике није значајна. Ови резултати су у складу са претходним истраживањима која показују да хитозан као носач може да делује као ефективна подршка за контролисано ослобађање антибиотика у циљу спречавања инфекција. (345) Међутим, када се упореде ефекти ципрофлоксацина и гентамицина на бактерије, ципрофлоксацин има снажнији и ефикаснији антимикуробни ефекат на оба бактеријска соја, што је нарочито важно за терапеутску примену. Разлика у ефикасности између ових антибиотика може се објаснити њиховим различитим механизмима деловања и физичким својствима. Већина истраживања усмерена на антимикуробно дејство синтетисаних скефолда методом електроспининга фокусира се на развој материјала који захваљујући својој специфичној структури и својствима, могу контролисано ослобађати активне молекуле као што су лекови, наночестице и мн. друге. Ови скефолди функционишу као носачи који омогућавају постепено испуштање активних супстанци, чиме се повећава ефикасност терапијског дејства и смањује ризик од појаве бактеријске резистенције. Литературни подаци указују да синтетисани електроспиновани носачи врло често су импрегнирани активним компонентама, док су студије које истражују скефолде који сами по себи имају антимикуробна својства ретке. (338) Међутим, у нашим истраживањима, скефолди желатина су показали да могу имати самостална антибактеријска својства без потребе за додатком активних молекула. (134)

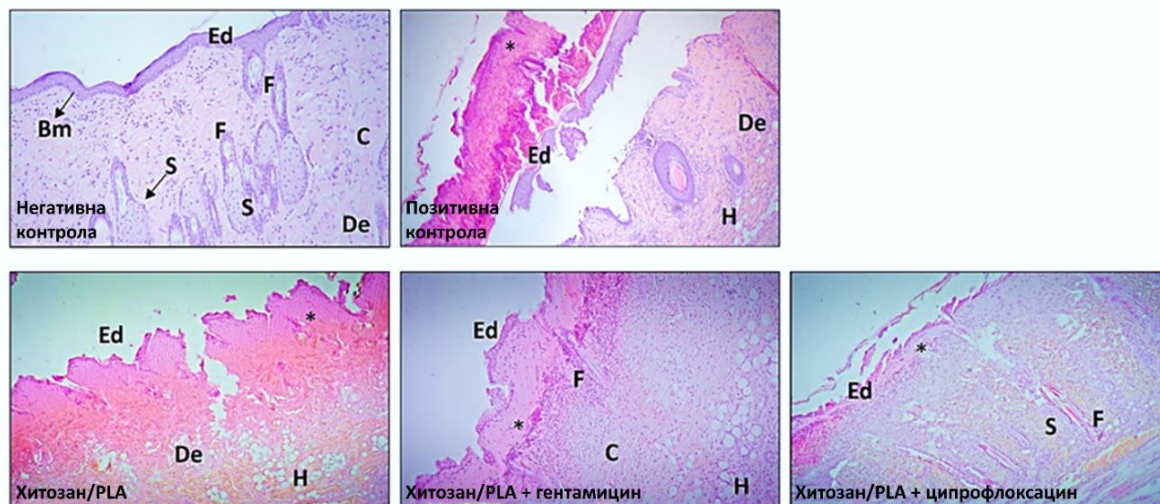
С обзиром на значајну улогу антимикуробних материјала у ткивном инжењерингу, ова истраживања су од велике важности. Анализа и процена антимикуробне активности су кључни за развој и избор материјала који ће бити коришћени у имплантима, уз превенцију инфекција. Добијени резултати показују обећавајући потенцијал хитозан/PLA скефолда. Иако сам хитозан/PLA није испољио антимикуробни ефекат, битна је и улога носача који је обезбедио контролисано испуштање импрегнираних агенаса и задржао структурни интегритет скефолда. Импрегнирани хитозан/PLA скефолди са ципрофлоксацином и гентамицином су показали различите степене активности, оба антибиотика имају значајну улогу у развоју антимикуробних носача.

4.3.6 Зарастање рана у *in vivo* условима

У циљу испитивања регенеративног потенцијала синтетисаних хитозан/PLA узорака, спроведена је *in vivo* студија на Wistar albino пацовима. Хистолошка анализа обухватала је поређење између здраве коже (негативна контрола), нетретиране опечене коже (позитивна контрола) и коже третиране хитозан/PLA скефолдима (Слика 58). Као што је очекивано, здрава кожа као негативна контрола показала је очувану структуру свих слојева — епидермиса, дермиса и хиподермиса — са добро дефинисаним сквамозним епителом и правилном дистрибуцијом колагена и еластичних влакана у дермису. Насупрот томе, нетретирани пресеци опечене коже, посматрани 7 дана након индукције ране, показали су изражено оштећење ткива, са некротичним епидермалним слојевима који се љуште са дермиса, присутним областима коагулативне некрозе, инфилтрацијом неутрофила и формирањем гранулационог ткива. Хистопатолошки преглед је потврдио да су све групе третиране хитозан/PLA скефолдима показале повећану регенерацију ткива у поређењу са позитивном контролом. Међутим, у групи која је третирана хитозан/PLA узорцима без антибиотика, примећена је спорија регенерација рана, виши ниво упале и смањено таложење екстрацелуларног матрикса у

односу на групе које су третиране хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин и хитозан/PLA 0.1% гентамицин скефолдима.

Међу групама узорка у којима су инкорпорисани антибиотици, група хитозан/PLA /0.1% ципрофлоксацин узорка је показала најбоље зарастање.



Слика 58. Резултати процеса зарастања рана након третмана хитозан/PLA скефолдима у *in vivo* условима. А) Репрезентативне слике Х&Е бојења парафинских делова негативне, позитивне контроле и после третмана скефолдима са инкорпорисаним ципрофлоксацин и гентамицин антибиотским агенсима (оригинално увећање x10). Ed: епидермис, Bm: Базална мембрана, De: дермис, F: фоликули длаке, S: лојна жлезда, C: колагена влакна, H: хиподермис, * област опекотина

Третман са хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин узорком је показао значајну епителизацију, која је обухватала побољшано сазревање епидермиса, формирање *stratum corneum* слоја, смањену густину инфламаторних ћелија и организовану диспозицију колагених влакана. Ови параметри указују на напредне процесе регенерације ткива у поређењу са другим групама узорка (Слика 58). Добијени резултати су у складу са претходно добијеним резултатима у овом истраживању (Скефолди желатина и PCL/PEG су такође показали најбољи регенеративни потенцијал са импрегнираним ципрофлоксацином). Ефекат ципрофлоксацина се показао доста снажним у супресији бактеријских инфекција и контроли инфламаторног одговора, што на неки начин обезбеђује повољно микроокружење за биолошке процесе. Организованији колагени матрикс након третмана хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин скефолдом, може се приписати смањеној инфламацији, што омогућава да фибробласти учествују у синтези колагена и ремоделирању ванћелијског матрикса. Интересантно је да је уочено присуство процеса неоангиогенезе у групи хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин скефолда. Новоформирани крвни судови су обезбедили неометан проток крви ка месту ране, и самим тиме и процес снабдевања неоопходним хранљивим материјама за ћелијску регенерацију и метаболичке активности.

Са друге стране, хитозан/PLA/0.1% гентамицин скефолди су показали мањи степен неоангиогенезе, што указује на то да врста антибиотског агенса утиче на каскаду процеса зарастања. Ова разлика може бити последица хемијских својстава гентамицина, који мање интерагује са хемијским компонентама ванћелијског матрикса у поређењу са ципрофлоксацином. Присуство ципрофлоксацина у хитозан/PLA скефолду не само да је

допринело антимикробној активности већ је такође подстакло процесе регенерације путем сложених интеракција са ванћелијским матриксом и сигналним путевима. Флуорохинолонска структура ципрофлоксацина омогућава интеракцију са ћелијским рецепторима, што може утицати на брзину инфламаторног одговора. (346) Поред тога, повећана хидрофилност скефолда због инкорпорације ципрофлоксацина побољшала је хидратацију ране, што је додатно подстакло и убрзало процес зарастања.

У случају гентамицина, његова мања способност да утиче на екстрацелуларни матрикс и сигналне путеве вероватно је ограничила његову ефикасност у процесу зарастања рана. Ипак, скефолди са инкорпорираним гентамицином су показали умерену антимикробну активност и способност да одрже структурни интегритет матрице. *In vivo* патохистолошки налази су у складу са ранијим студијама које су показале да скефолди са додатим антибиотцима могу значајно убрзати зарастање рана. (347), (348) Употреба хитозан/PLA/0.1% ципрофлоксацин скефолда показала је сличне ефекте као и влакна на бази хитозана и полиетилен оксида (PEO) са ципрофлоксацином, која су такође показала побољшану регенерацију ткива и повећану васкуларизацију. (349)

Битно је напоменути, да комбинација хитозан/PLA полимера показује значајан потенцијал за домен ткивног инжењеринга, пре свега због својих физичко-хемијских и биолошких својстава. PLA доприноси механичкој стабилности и структурном интегритету, док хитозан обезбеђује биактивност и побољшану ћелијску адхезију. Њиховом комбинацијом добија се компатибилан и биоразградив скефолд који омогућава оптимално окружење за раст и пролиферацију ћелија. Млечна киселина је позната као хидроксикарбоксилна киселина са својствима која убрзавају процес зарастања рана. (350) Поред тога, PLA обезбеђује контролисану разградњу матрице, што је кључно за отпуштање антибиотских агенаса током процеса зарастања ране.

Са друге стране, хитозан показује биолошку активност која подстиче синтезу колагена и пролиферацију ћелија, самим тиме убрзавајући процес реепителизације. Према литературним подацима, синтетисана хитозан/PLA влакна са инкорпорираним уљем бакалара су била испитивана у третману дијабетичких рана код пацова. Добијени резултати су показали да оваква матрица значајно убрзава процес зарастања рана и омогућава адекватно отпуштање активног агенса из скефолда. (351) Уочено је побољшање у реепителизацији, што потврђује потенцијал овакве комбинације полимера у лечењу кожних лезија, посебно у условима нарушене физиолошке регенерације, као што је случај код дијабетичких стања. Резултати других истраживања су такође потврдили ефикасност хитозан/PLA влакана у процесу зарастања рана. Синергистичко дејство ова два полимера пружа повољно микроокружење за регенерацију ткива, уз побољшану реепителизацију, формирање гранулационог ткива и смањеном инфламаторном одговору. (352) Овакав тип биоматеријала, представља обећавајућег кандидата за будуће клиничке примене у лечењу акутних и хроничних рана.

5 Закључак

Резултати ове докторске дисертације пружају увид у синтезу вештачких наноматеријала методом електроспининга. Добијени резултати за сваку класу синтетисаних наноматеријала (скефолда) су сумирани у следећим закључцима:

- ✓ Ефикасност PCL/PEG скефолда
 - ❖ Анализирано је 125 раствора полимера у 14 серија, од којих је 81 узорак био погодан за формирање електроспинованих влакана са циљем примене у ткивном инжењерингу
 - ❖ Микроскопска анализа потврдила је корелацију између својстава полимера и морфологије добијених влакана, омогућавајући развој AI модела за предвиђање оптималних услова синтезе
 - ❖ AI модел је пружио прецизна предвиђања за додатне серије раствора полимера
 - ❖ Тестирани скефолди су показали оптималну биокомпатибилност, што је потврђено испитивањем у *in vitro* методама цитотоксичности и зарастања рана
 - ❖ Ћелијска адхезија и вијабилност ADMSC ћелија унутар структуре влакана је доказана помоћу SEM микроскопије
 - ❖ Механичке особине синтетичких PCL/PEG влакана су показале боље резултате модела индентације у односу на литературне податке за испитивана PCL влакна
 - ❖ Микробиолошке анализе су потврдиле значајан антимикробни ефекат PCL/PEG скефолда
 - ❖ Испитивање третмана на САМ мембрани кокошјих јаја показало је позитиван утицај скефолда на процес неоангиогенезе, што указује на њихов потенцијал за стварање нових крвних судова, подстицање процеса васкуларизације и убрзану регенерацију ткива у процесу зарастања рана
 - ❖ *In vivo* студија на Wistar albino пацовима показала је значајно убрзање процеса регенерације и зарастања рана након опекотина, посебно у групи третираној са PCL/PEG/0.1% ципрофлоксацином. Хистопатолошка микроскопска анализа је открила побољшано формирање и организацију колагених влакана, што указује на позитиван утицај овог третмана на регенерацију екстрацелуларног матрикса (ECM)
- ✓ Ефикасност скефолда желатина
 - ❖ Особине биокомпатибилности и нетоксичности су биле потврђене код скефолда желатина, иако су били умрежени уз помоћ глутаралдехида, што указује на ефикасан принцип одабира процеса умрежавања
 - ❖ Микробиолошки тестови су показали да сам узорак желатина, без инкорпорираних антибиотика, поседује антибактеријски ефекат, што указује на његову потенцијалну употребу у превенцији инфекција, нарочито у домену зарастања рана. Резултати са инкорпорираним антибиотцима су значајно побољшали антибактеријски ефекат скефолда желатина
 - ❖ Резултати високе стопе апсорпције воде и убрзане деградације, нарочито у присуству инкорпорираног ципрофлоксацина у структури желатина, указују на утицај антибиотика на структурну стабилност и убрзану деградабилност материјала

- ❖ FTIR метода је потврдила стабилност структуре синтетисаних скефолда, а помоћу EDS мапирања је доказано присуство антибиотских агенаса у структури влакана
- ❖ САМ тест је потврдио биокompatibilност скефолда и њихову способност да иницирају стварање нових крвних судова у процесу неоангиогенезе, што је од великог значаја за примену у регенеративној медицини
- ❖ *In vivo* третман на пацовима показао је значајно побољшање процеса регенерације и зарастања рана након опекотина, посебно код третмана са желатин/0.1% ципрофлоксацин узорцима

✓ Ефикасност хитозан/PLA скефолда

- ❖ Анализа морфологије хитозан/PLA скефолда је показала изузетну структурну организацију влакана. Вlakна су била равномерно распоређена, порозна, што је важно за омогућавање дифузије хранљивих материја и ћелијску адхезију у процесу зарастања рана
- ❖ Хитозан/PLA скефолди су показали високу биокompatibilност без токсичних ефеката
- ❖ Адекватан степен апсорпције воде је био добијен у тесту апсорпције, што је неопходно током процеса хидратације ране и регенерације ткива. Такође, узорци су деградирали у контролисаним условима, са бржом деградацијом у присуству инкорпорираног ципрофлоксацина, што омогућава континуирано ослобађање антибиотика током процеса зарастања
- ❖ Сам хитозан/PLA скефолд није показао антимикуробну активност, али након инкорпорације антибиотика, постигнут је значајан антимикуробни ефекат
- ❖ FTIR анализа је потврдила успешно везивање антибиотика унутар структуре скефолда, што указује на њихову способност да могу ефикасно ослобађати активне супстанце у локалном окружењу ране, побољшавајући терапеутски ефекат
- ❖ Патохистолошка анализа опекотина у *in vivo* студији на пацовима, показала је уредну организацију колагених влакана у ткиву око ране, што указује на позитиван утицај ових скефолда на формирање екстрацелуларног матрикса и подршку ћелијској адхезији, пролиферацији и диференцијацији

✓ **Коначан закључак**

- ❖ На основу добијених анализа у овом истраживању, све три класе полимерних скефолда су показале изванредне резултате. Ниједан од скефолда није показао токсичне последице након *in vitro* и *in vivo* третмана, штавише су показале одличну биокompatibilност у ћелијској средини, а затим и на моделима живих организама. Инкорпорација антибиотских агенаса као што су ципрофлоксацин и гентамицин су значајно обогатили структуру и допринели ефикасности у процесима спречавања инфекција, побољшали вијабилност ћелија, пролиферацију, процес неоангиогенезе и зарастања рана. У смислу упоређивања ефикасности скефолда по класама, може се рећи да свака класа је показала добре резултате у сваком од анализираних тестова. Међутим, када говоримо о примени у ткивном инжењерингу, конкретно о домену зарастања рана, комбинација природних и синтетичких влакана је добитна за такву врсту примене. Синтетичка влакна пружају потпору, одговарајућу механичку стабилност, док природна

влакна омогућавају бољу адаптацију биолошкој средини, због својих хемијских и физичких особина. У циљу побољшања развоја вештачких материјала, можда је неопходна оптимизација концентрација активних агенаса као и додатак нових молекула као што су антиинфламаторни агенси, протромбични фактори и наночестице који би били инкорпорирани унутар матрица, чиме би се проширила примена ових материјала у регенеративној медицини.

Литература

1. Whitman AG, Lambert PJ, Dyson OF, Akula SM. Applications of Nanotechnology in the Biomedical Sciences: Small Materials, Big Impacts, and Unknown Consequences. In: Jotterand F, editor. *Emerg. Concept. Ethical Policy Issues Bionanotechnol.*, vol. 101, Dordrecht: Springer Netherlands; 2008, p. 117–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8649-6_8.
2. Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomater* 2005;26:2603–10. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.051>.
3. Venugopal J, Vадgama P, Kumar TSS, Ramakrishna S. Biocomposite nanofibres and osteoblasts for bone tissue engineering. *Nanotechnology* 2007;18:055101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/5/055101>.
4. Cimini A, Borgioni A, Passarini E, Mancini C, Proietti A, Buccini L, et al. Upscaling of Electrospinning Technology and the Application of Functionalized PVDF-HFP@TiO₂ Electrospun Nanofibers for the Rapid Photocatalytic Deactivation of Bacteria on Advanced Face Masks. *Polymers* 2023;15:4586. <https://doi.org/10.3390/polym15234586>.
5. *Bionanocomposites in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier; 2021. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-03520-0>.
6. Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol* 2011;6:13–22. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.246>.
7. Belbéoch C, Lejeune J, Vroman P, Salaün F. Silkworm and spider silk electrospinning: a review. *Environ Chem Lett* 2021;19:1737–63. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01147-x>.
8. Vollrath F, Knight DP. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* 2001;410:541–8. <https://doi.org/10.1038/35069000>.
9. Woodings C. *Regenerated cellulose fibres*. Woodhead Publishing Limited; 2001. <https://doi.org/10.1533/9781855737587>.
10. Gupta VB, Kothari VK, editors. *Manufactured Fibre Technology*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1997. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-5854-1>.
11. II. A letter concerning the electricity of water, from Mr. Stephen Gray to Cromwell Mortimer, M. D. *Secr. R. S. Philos Trans R Soc Lond* 1731;37:227–60. <https://doi.org/10.1098/rstl.1731.0040>.
12. Luo CJ, Stoyanov SD, Stride E, Pelan E, Edirisinghe M. Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence. *Chem Soc Rev* 2012;41:4708. <https://doi.org/10.1039/c2cs35083a>.
13. Tucker N, Stanger JJ, Staiger MP, Razzaq H, Hofman K. The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995. *J Eng Fibers Fabr* 2012;7:155892501200702S10. <https://doi.org/10.1177/155892501200702S10>.
14. Salem DR, editor. *Structure Formation in Polymeric Fibers*. München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG; 2001. <https://doi.org/10.3139/9783446456808>.
15. Reneker DH, Yarin AL, Zussman E, Xu H. Electrospinning of Nanofibers from Polymer Solutions and Melts. *Adv. Appl. Mech.*, vol. 41, Elsevier; 2007, p. 43–346. [https://doi.org/10.1016/S0065-2156\(07\)41002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2156(07)41002-X).
16. Anu Bhushani J, Anandharamakrishnan C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends Food Sci Technol* 2014;38:21–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.004>.

17. Boys CV. On the Production, Properties, and some suggested Uses of the Finest Threads. *Proc Phys Soc Lond* 1887;9:8–19. <https://doi.org/10.1088/1478-7814/9/1/303>.
18. Tucker N. Chapter 3. The Development of Electrospinning Technologies for Commercial Application. In: Mitchell GR, editor. *Polym. Chem. Ser.*, Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2015, p. 34–56. <https://doi.org/10.1039/9781849735575-00034>.
19. Dzenis Y. Spinning Continuous Fibers for Nanotechnology. *Science* 2004;304:1917–9. <https://doi.org/10.1126/science.1099074>.
20. Jian S, Zhu J, Jiang S, Chen S, Fang H, Song Y, et al. Nanofibers with diameter below one nanometer from electrospinning. *RSC Adv* 2018;8:4794–802. <https://doi.org/10.1039/C7RA13444D>.
21. Kumar Sharma G, Rachel James N. Electrospinning: The Technique and Applications. In: Khan M, Jerold Samuel Chelladurai S, editors. *Recent Dev. Nanofibers Res.*, IntechOpen; 2023. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105804>.
22. Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chem Rev* 2019;119:5298–415. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>.
23. Disintegration of water drops in an electric field. *Proc R Soc Lond Ser Math Phys Sci* 1964;280:383–97. <https://doi.org/10.1098/rspa.1964.0151>.
24. Zhao J, Chen L, Ma A, Bai X, Zeng Y, Liu D, et al. Recent advances in coaxial electrospun nanofibers for wound healing. *Mater Today Bio* 2024;29:101309. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101309>.
25. Reneker DH, Yarin AL, Fong H, Koombhongse S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J Appl Phys* 2000;87:4531–47. <https://doi.org/10.1063/1.373532>.
26. Dai H, Gong J, Kim H, Lee D. A novel method for preparing ultra-fine alumina-borate oxide fibres via an electrospinning technique. *Nanotechnology* 2002;13:674–7. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/13/5/327>.
27. Li D, Wang Y, Xia Y. Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays. *Nano Lett* 2003;3:1167–71. <https://doi.org/10.1021/nl0344256>.
28. Kleivaitė V, Milašius R. Electrospinning – 100 Years of Investigations and Still Open Questions of Web Structure Estimation. *Autex Res J* 2018;18:398–404. <https://doi.org/10.1515/aut-2018-0021>.
29. Haider A, Haider S, Kang I-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab J Chem* 2018;11:1165–88. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>.
30. Atala A, Sefat F, Mozafari M, editors. *Handbook of tissue engineering scaffolds: Volume one*. Duxford: Woodhead Publishing, an imprint of Elsevier; 2019.
31. Odularu AT. Basic Principles of Electrospinning, Mechanisms, Nanofibre Production, and Anticancer Drug Delivery. *J Chem* 2022;2022:1–15. <https://doi.org/10.1155/2022/9283325>.
32. Moon S, Gil M, Lee KJ. Syringeless Electrospinning toward Versatile Fabrication of Nanofiber Web. *Sci Rep* 2017;7:41424. <https://doi.org/10.1038/srep41424>.
33. Ahmadi Bonakdar M, Rodrigue D. Electrospinning: Processes, Structures, and Materials. *Macromol* 2024;4:58–103. <https://doi.org/10.3390/macromol4010004>.
34. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol* 2003;63:2223–53. [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7).

35. Yousefzadeh M, Ramakrishna S. Modeling performance of electrospun nanofibers and nanofibrous assemblies. *Electrospun Nanofibers*, Elsevier; 2017, p. 303–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100907-9.00013-1>.
36. Al-Abduljabbar A, Farooq I. Electrospun Polymer Nanofibers: Processing, Properties, and Applications. *Polymers* 2022;15:65. <https://doi.org/10.3390/polym15010065>.
37. Taylor SR. Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table. *Geochim Cosmochim Acta* 1964;28:1273–85. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(64\)90129-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(64)90129-2).
38. Fong H, Chun I, Reneker DH. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 1999;40:4585–92. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00068-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00068-3).
39. Bakar SSS, Foong KM, Halif NA, Yahud S. Effect of solution concentration and applied voltage on electrospun polyacrylonitrile fibers. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 2019;701:012018. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/701/1/012018>.
40. Liu Y, Dong L, Fan J, Wang R, Yu J. Effect of applied voltage on diameter and morphology of ultrafine fibers in bubble electrospinning. *J Appl Polym Sci* 2011;120:592–8. <https://doi.org/10.1002/app.33203>.
41. Long Y-Z, Yan X, Wang X-X, Zhang J, Yu M. Electrospinning. *Electrospinning Nanofabrication Appl.*, Elsevier; 2019, p. 21–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51270-1.00002-9>.
42. Mu X, Zheng Y, Xin B. Effects of the electric field distribution on electrospun PET fibers properties. *J Phys Conf Ser* 2021;1790:012059. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1790/1/012059>.
43. Zargham S, Bazgir S, Tavakoli A, Rashidi AS, Damerchely R. The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber. *J Eng Fibers Fabr* 2012;7:155892501200700414. <https://doi.org/10.1177/155892501200700414>.
44. Khoda B, Gramlich W, Shovon SMN, Khalil I. Effect of molecular weight on polymer solution facilitated transfer of non-Brownian particles. *Prog Org Coat* 2023;176:107394. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.107394>.
45. Fan L, Xu Y, Zhou X, Chen F, Fu Q. Effect of salt concentration in spinning solution on fiber diameter and mechanical property of electrospun styrene-butadiene-styrene tri-block copolymer membrane. *Polymer* 2018;153:61–9. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.08.008>.
46. Aulova A, Bek M, Kossovich L, Emri I. Needleless Electrospinning of PA6 Fibers: The Effect of Solution Concentration and Electrospinning Voltage on Fiber Diameter. *Stroj Vestn – J Mech Eng* 2020;66:421–30. <https://doi.org/10.5545/sv-jme.2020.6713>.
47. Nartetamrongsutt K, Chase GG. The influence of salt and solvent concentrations on electrospun polyvinylpyrrolidone fiber diameters and bead formation. *Polymer* 2013;54:2166–73. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.02.028>.
48. Rezaei B, Shoushtari AM, Rabiee M, Uzun L, Turner APF, Cheung Mak W. Multifactorial modeling and optimization of solution and electrospinning parameters to generate superfine polystyrene nanofibers. *Adv Polym Technol* 2018;37:2743–55. <https://doi.org/10.1002/adv.21947>.
49. Sun Z, Deitzel JM, Knopf J, Chen X, Gillespie JW. The effect of solvent dielectric properties on the collection of oriented electrospun fibers. *J Appl Polym Sci* 2012;125:2585–94. <https://doi.org/10.1002/app.35454>.
50. Nezarati RM, Eifert MB, Cosgriff-Hernandez E. Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Eng Part C Methods* 2013;19:810–9. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0671>.
51. Wines TH, Mokhatab S. Fundamentals of separation science. *Contam. Control Nat. Gas Ind.*, Elsevier; 2022, p. 25–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816986-5.00002-7>.

52. Hekmati AH, Rashidi A, Ghazisaeidi R, Drean J-Y. Effect of needle length, electrospinning distance, and solution concentration on morphological properties of polyamide-6 electrospun nanowebs. *Text Res J* 2013;83:1452–66. <https://doi.org/10.1177/0040517512471746>.
53. Keirouz A, Wang Z, Reddy VS, Nagy ZK, Vass P, Buzgo M, et al. The History of Electrospinning: Past, Present, and Future Developments. *Adv Mater Technol* 2023;8:2201723. <https://doi.org/10.1002/admt.202201723>.
54. Nayak R, Padhye R, Arnold L. Melt-electrospinning of nanofibers. *Electrospun Nanofibers*, Elsevier; 2017, p. 11–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100907-9.00002-7>.
55. Chinnappan BA, Krishnaswamy M, Xu H, Hoque ME. Electrospinning of Biomedical Nanofibers/Nanomembranes: Effects of Process Parameters. *Polymers* 2022;14:3719. <https://doi.org/10.3390/polym14183719>.
56. Refate A, Mohamed Y, Mohamed M, Sobhy M, Samhy K, Khaled O, et al. Influence of electrospinning parameters on biopolymers nanofibers, with emphasis on cellulose & chitosan. *Heliyon* 2023;9:e17051. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17051>.
57. Lasprilla-Botero J, Álvarez-Láinez M, Lagaron JM. The influence of electrospinning parameters and solvent selection on the morphology and diameter of polyimide nanofibers. *Mater Today Commun* 2018;14:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2017.12.003>.
58. Perez-Puyana VM, Romero A, Guerrero A, Moroni L, Wieringa PA. Enabling low molecular weight electrospinning through binary solutions of polymer blends. *Mater* 2025;6:100306. <https://doi.org/10.1016/j.nxmater.2024.100306>.
59. Okutan N, Terzi P, Altay F. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocoll* 2014;39:19–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.022>.
60. Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 2001;42:261–72. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00250-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00250-0).
61. Luzio A, Canesi E, Bertarelli C, Caironi M. Electrospun Polymer Fibers for Electronic Applications. *Materials* 2014;7:906–47. <https://doi.org/10.3390/ma7020906>.
62. Amariei N, Manea LR, Berteau AP, Berteau A, Popa A. The Influence of Polymer Solution on the Properties of Electrospun 3D Nanostructures. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 2017;209:012092. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/209/1/012092>.
63. Hristian L, Ostafe MM, Manea LR, Leon AL. The study about the use of the natural fibres in composite materials. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 2016;145:032004. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/145/3/032004>.
64. Ki CS, Baek DH, Gang KD, Lee KH, Um IC, Park YH. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer* 2005;46:5094–102. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.040>.
65. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* 2010;28:325–47. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
66. Frenot A, Chronakis IS. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2003;8:64–75. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(03)00004-9).
67. Greiner A, Wendorff JH. Functional Self-Assembled Nanofibers by Electrospinning. In: Shimizu T, editor. *Self-Assem. Nanomater. I*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008, p. 107–71. https://doi.org/10.1007/12_2008_146.
68. Mailley D, Hébraud A, Schlatter G. A Review on the Impact of Humidity during Electrospinning: From the Nanofiber Structure Engineering to the Applications. *Macromol Mater Eng* 2021;306:2100115. <https://doi.org/10.1002/mame.202100115>.

69. Lei S, Wang L, Quan Z, Qin X, Yu J. Jet diameter of the first coil in the electrospinning whipping region: the role of fluid viscosity. *Text Res J* 2022;92:4260–8. <https://doi.org/10.1177/00405175221080699>.
70. Pelipenko J, Kristl J, Janković B, Baumgartner S, Kocbek P. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *Int J Pharm* 2013;456:125–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.078>.
71. Collins G, Federici J, Imura Y, Catalani LH. Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications. *J Appl Phys* 2012;111:044701. <https://doi.org/10.1063/1.3682464>.
72. Dogu I. Fundamentals of Electrostatic Spinning Part IV:-: Ionization of Atmospheric Air under Action of an Electric Field. *Text Res J* 1984;54:111–9. <https://doi.org/10.1177/004051758405400207>.
73. Huang L, Bui N, Manickam SS, McCutcheon JR. Controlling electrospun nanofiber morphology and mechanical properties using humidity. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2011;49:1734–44. <https://doi.org/10.1002/polb.22371>.
74. Yazgan G, Popa AM, Rossi RM, Maniura-Weber K, Puigmartí-Luis J, Crespy D, et al. Tunable release of hydrophilic compounds from hydrophobic nanostructured fibers prepared by emulsion electrospinning. *Polymer* 2015;66:268–76. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.04.045>.
75. Fashandi H, Karimi M. Pore formation in polystyrene fiber by superimposing temperature and relative humidity of electrospinning atmosphere. *Polymer* 2012;53:5832–49. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2012.10.003>.
76. Fashandi H, Karimi M. Characterization of porosity of polystyrene fibers electrospun at humid atmosphere. *Thermochim Acta* 2012;547:38–46. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2012.08.003>.
77. Fashandi H, Karimi M. Comparative Studies on the Solvent Quality and Atmosphere Humidity for Electrospinning of Nanoporous Polyetherimide Fibers. *Ind Eng Chem Res* 2014;53:235–45. <https://doi.org/10.1021/ie4028846>.
78. Megelski S, Stephens JS, Chase DB, Rabolt JF. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules* 2002;35:8456–66. <https://doi.org/10.1021/ma020444a>.
79. Lu P, Xia Y. Maneuvering the Internal Porosity and Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Yarns by Controlling the Solvent and Relative Humidity. *Langmuir* 2013;29:7070–8. <https://doi.org/10.1021/la400747y>.
80. Ahmed A, Xu L. Numerical analysis of the electrospinning process for fabrication of composite fibers. *Therm Sci* 2020;24:2377–83. <https://doi.org/10.2298/TSCI2004377A>.
81. Kenry, Lim CT. Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Prog Polym Sci* 2017;70:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002>.
82. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Lim T-C, Ma Z. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. *WORLD SCIENTIFIC*; 2005. <https://doi.org/10.1142/5894>.
83. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Yong T, Ma Z, Ramaseshan R. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Mater Today* 2006;9:40–50. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(06\)71389-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(06)71389-X).
84. Zhang YZ, Feng Y, Huang Z-M, Ramakrishna S, Lim CT. Fabrication of porous electrospun nanofibres. *Nanotechnology* 2006;17:901–8. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/3/047>.

85. Koombhongse S, Liu W, Reneker DH. Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2001;39:2598–606. <https://doi.org/10.1002/polb.10015>.
86. Han T, Reneker DH, Yarin AL. Buckling of jets in electrospinning. *Polymer* 2007;48:6064–76. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.08.002>.
87. McCann JT, Chen JIL, Li D, Ye Z-G, Xia Y. Electrospinning of polycrystalline barium titanate nanofibers with controllable morphology and alignment. *Chem Phys Lett* 2006;424:162–6. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2006.04.082>.
88. Kessick R, Tepper G. Microscale polymeric helical structures produced by electrospinning. *Appl Phys Lett* 2004;84:4807–9. <https://doi.org/10.1063/1.1762704>.
89. Huang S, Fu Q, Yan L, Kasal B. Characterization of interfacial properties between fibre and polymer matrix in composite materials – A critical review. *J Mater Res Technol* 2021;13:1441–84. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.05.076>.
90. Tian M, Ma Z, Yang G-Z. Micro/nanosystems for controllable drug delivery to the brain. *The Innovation* 2024;5:100548. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100548>.
91. Sun Z, Zussman E, Yarin AL, Wendorff JH, Greiner A. Compound Core–Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning. *Adv Mater* 2003;15:1929–32. <https://doi.org/10.1002/adma.200305136>.
92. Bhat PP, Appathurai S, Harris MT, Pasquali M, McKinley GH, Basaran OA. Formation of beads-on-a-string structures during break-up of viscoelastic filaments. *Nat Phys* 2010;6:625–31. <https://doi.org/10.1038/nphys1682>.
93. Liu Y, Wang Y, Lee C-H, Kan C-W, Chua H. Synthesis of Biodegradable Plastics from Dyeing Wastewater and Optimization of Continuous Poly(3-Hydroxybutyrate) Fibrous Membranes via Electrospinning Process. *J Mater Sci Chem Eng* 2020;08:71–9. <https://doi.org/10.4236/msce.2020.812006>.
94. Frey H, Johann T. Celebrating 100 years of “polymer science”: Hermann Staudinger’s 1920 manifesto. *Polym Chem* 2020;11:8–14. <https://doi.org/10.1039/C9PY90161B>.
95. Patil SV, Shelake SS, Patil SS. Polymeric materials for targeted delivery of bioactive agents and drugs. *Fundam. Biomater. Polym.*, Elsevier; 2018, p. 249–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102194-1.00011-6>.
96. Reddy MSB, Ponnammamma D, Choudhary R, Sadasivuni KK. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers* 2021;13:1105. <https://doi.org/10.3390/polym13071105>.
97. Zhang ZP, Rong MZ, Zhang MQ. Polymer engineering based on reversible covalent chemistry: A promising innovative pathway towards new materials and new functionalities. *Prog Polym Sci* 2018;80:39–93. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.03.002>.
98. Pires PC, Mascarenhas-Melo F, Pedrosa K, Lopes D, Lopes J, Macário-Soares A, et al. Polymer-based biomaterials for pharmaceutical and biomedical applications: A focus on topical drug administration. *Eur Polym J* 2023;187:111868. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.111868>.
99. Satchanska G, Davidova S, Petrov PD. Natural and Synthetic Polymers for Biomedical and Environmental Applications. *Polymers* 2024;16:1159. <https://doi.org/10.3390/polym16081159>.
100. D R, Rao P. Nanoparticles: Is Toxicity a Concern? *EJIFCC* 2011;22:92–101.
101. Arif ZU. The role of polysaccharide-based biodegradable soft polymers in the healthcare sector. *Adv Ind Eng Polym Res* 2024;S2542504824000241. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2024.05.001>.

102. Wang S, Ju J, Wu S, Lin M, Sui K, Xia Y, et al. Electrospinning of biocompatible alginate-based nanofiber membranes via tailoring chain flexibility. *Carbohydr Polym* 2020;230:115665. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115665>.
103. Bonino CA, Krebs MD, Saquing CD, Jeong SI, Shearer KL, Alsberg E, et al. Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. *Carbohydr Polym* 2011;85:111–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.002>.
104. Kim Y, Zharkinbekov Z, Raziyeveva K, Tabyldiyeva L, Berikova K, Zhumagul D, et al. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Regeneration. *Pharmaceutics* 2023;15:807. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030807>.
105. Sultankulov B, Berillo D, Sultankulova K, Tokay T, Saparov A. Progress in the Development of Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biomolecules* 2019;9:470. <https://doi.org/10.3390/biom9090470>.
106. Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydr Polym* 2013;92:1262–79. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>.
107. Aldana AA, Abraham GA. Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications. *Int J Pharm* 2017;523:441–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.044>.
108. Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. *Polymers* 2010;2:522–53. <https://doi.org/10.3390/polym2040522>.
109. Farzi G, Gheysipour M. Encapsulation with polymers. *Princ. Biomater. Encapsulation Vol. Two*, Elsevier; 2023, p. 3–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824345-9.00010-6>.
110. Nemati S, Kim S, Shin YM, Shin H. Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. *Nano Converge* 2019;6:36. <https://doi.org/10.1186/s40580-019-0209-y>.
111. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci* 2010;35:1217–56. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>.
112. Mateos-Timoneda MA. Polymers for bone repair. *Bone Repair Biomater.*, Elsevier; 2009, p. 231–51. <https://doi.org/10.1533/97818456966610.2.231>.
113. Dwivedi R, Kumar S, Pandey R, Mahajan A, Nandana D, Katti DS, et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *J Oral Biol Craniofacial Res* 2020;10:381–8. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.10.003>.
114. Munsch M. Laser additive manufacturing of customized prosthetics and implants for biomedical applications. *Laser Addit. Manuf.*, Elsevier; 2017, p. 399–420. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100433-3.00015-4>.
115. Manoukian OS, Matta R, Letendre J, Collins P, Mazzocca AD, Kumbar SG. Electrospun Nanofiber Scaffolds and Their Hydrogel Composites for the Engineering and Regeneration of Soft Tissues. In: Petrosko SH, Day ES, editors. *Biomed. Nanotechnol.*, vol. 1570, New York, NY: Springer New York; 2017, p. 261–78. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6840-4_18.
116. Engel E, Michiardi A, Navarro M, Lacroix D, Planell JA. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. *Trends Biotechnol* 2008;26:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.10.005>.
117. Cooper A, Bhattarai N, Zhang M. Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydr Polym* 2011;85:149–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.008>.

118. Sell SA, McClure MJ, Garg K, Wolfe PS, Bowlin GL. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:1007–19. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.012>.
119. Virijević K, Živanović MN, Nikolić D, Milivojević N, Pavić J, Morić I, et al. AI-Driven Optimization of PCL/PEG Electrospun Scaffolds for Enhanced In Vivo Wound Healing. *ACS Appl Mater Interfaces* 2024;acsami.4c03266. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c03266>.
120. Lam CXF, Savalani MM, Teoh S-H, Huttmacher DW. Dynamics of *in vitro* polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions. *Biomed Mater* 2008;3:034108. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034108>.
121. Quartinello F, Guebitz GM, Ribitsch D. Surface functionalization of polyester. *Methods Enzymol.*, vol. 627, Elsevier; 2019, p. 339–60. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.08.007>.
122. Peltoniemi H, Ashammakhi N, Kontio R, Waris T, Salo A, Lindqvist C, et al. The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2002;94:5–14. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.122160>.
123. James R, Manoukian OS, Kumbar SG. Poly(lactic acid) for delivery of bioactive macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;107:277–88. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.009>.
124. Holmes RE, Cohen SR, Cornwall GB, Thomas KA, Kleinhenz KK, Beckett MZ. MacroPore resorbable devices in craniofacial surgery. *Clin Plast Surg* 2004;31:393–406. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2004.03.003>.
125. Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:459–76. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00022-4).
126. Manohar D, Babu RS, Vijaya B, Nallakumar S, Gobi R, Anand S, et al. A review on exploring the potential of PVA and chitosan in biomedical applications: A focus on tissue engineering, drug delivery and biomedical sensors. *Int J Biol Macromol* 2024;283:137318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137318>.
127. Manoukian OS, Sardashti N, Stedman T, Gailiunas K, Ojha A, Penalosa A, et al. Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Encycl. Biomed. Eng.*, Elsevier; 2019, p. 462–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64098-9>.
128. Zustiak SP, Leach JB. Hydrolytically Degradable Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Scaffolds with Tunable Degradation and Mechanical Properties. *Biomacromolecules* 2010;11:1348–57. <https://doi.org/10.1021/bm100137q>.
129. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* 2015;6:105–21. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
130. Raina N, Pahwa R, Bhattacharya J, Paul AK, Nissapatorn V, De Lourdes Pereira M, et al. Drug Delivery Strategies and Biomedical Significance of Hydrogels: Translational Considerations. *Pharmaceutics* 2022;14:574. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030574>.
131. Vhora I, Khatri N, Misra A. Applications of Polymers in Parenteral Drug Delivery. *Appl. Polym. Drug Deliv.*, Elsevier; 2021, p. 221–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819659-5.00008-2>.
132. Gomes SR, Rodrigues G, Martins GG, Roberto MA, Mafra M, Henriques CMR, et al. In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study. *Mater Sci Eng C* 2015;46:348–58. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.10.051>.

133. Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *Int J Pharm* 2015;484:57–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.02.043>.
134. Virrijević K, Živanović M, Pavić J, Dragačević L, Ljujić B, Miletić Kovačević M, et al. Electrospun Gelatin Scaffolds with Incorporated Antibiotics for Skin Wound Healing. *Pharmaceutics* 2024;17:851. <https://doi.org/10.3390/ph17070851>.
135. Liu D, Nikoo M, Boran G, Zhou P, Regenstein JM. Collagen and Gelatin. *Annu Rev Food Sci Technol* 2015;6:527–57. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>.
136. Girja S, Pk S, Md Aftab A. Scaffold-based microsphere in drug delivery system. *Int J Nanomater Nanotechnol Nanomedicine* 2024;10:016–22. <https://doi.org/10.17352/2455-3492.000058>.
137. Chen M, Li Y, Besenbacher F. Electrospun Nanofibers-Mediated On-Demand Drug Release. *Adv Healthc Mater* 2014;3:1721–32. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400166>.
138. Alam J, Rahman W, Mazid RA, Khan MR. Gamma-Irradiated Gelatin-Based Films Modified by HEMA for Medical Application. *Int J Polym Anal Charact* 2015;20:426–34. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2015.1035542>.
139. Shalumon KT, Anulekha KH, Chennazhi KP, Tamura H, Nair SV, Jayakumar R. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2011;48:571–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.01.020>.
140. Dai T, Tanaka M, Huang Y-Y, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:857–79. <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>.
141. Jiménez-Gómez CP, Cecilia JA. Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. *Molecules* 2020;25:3981. <https://doi.org/10.3390/molecules25173981>.
142. Abugoch LE, Tapia C, Villamán MC, Yazdani-Pedram M, Díaz-Dosque M. Characterization of quinoa protein–chitosan blend edible films. *Food Hydrocoll* 2011;25:879–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.008>.
143. Xu F, Weng B, Gilkerson R, Materon LA, Lozano K. Development of tannic acid/chitosan/pullulan composite nanofibers from aqueous solution for potential applications as wound dressing. *Carbohydr Polym* 2015;115:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.081>.
144. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>.
145. Chen Y-L, Chen H-C, Lee H-P, Chan H-Y, Hu Y-C. Rational development of GAG-augmented chitosan membranes by fractional factorial design methodology. *Biomaterials* 2006;27:2222–32. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.029>.
146. Madhally SV, Matthew HWT. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999;20:1133–42. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00011-3).
147. Cui C, Sun S, Wu S, Chen S, Ma J, Zhou F. Electrospun chitosan nanofibers for wound healing application. *Eng Regen* 2021;2:82–90. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2021.08.001>.
148. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000;46:1–27. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9).
149. Haider A, Khan S, Iqbal DN, Khan SU, Haider S, Mohammad K, et al. Chitosan as a tool for tissue engineering and rehabilitation: Recent developments and future perspectives – A review. *Int J Biol Macromol* 2024;278:134172. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134172>.

150. Ganesh SS, Anushikaa R, Swetha Victoria VS, Lavanya K, Shanmugavadivu A, Selvamurugan N. Recent Advancements in Electrospun Chitin and Chitosan Nanofibers for Bone Tissue Engineering Applications. *J Funct Biomater* 2023;14:288. <https://doi.org/10.3390/jfb14050288>.
151. Lannutti J, Reneker D, Ma T, Tomasko D, Farson D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C* 2007;27:504–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.019>.
152. Sill TJ, Von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29:1989–2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>.
153. Gholipour Kanani A, Bahrami SH. Effect of Changing Solvents on Poly(-Caprolactone) Nanofibrous Webs Morphology. *J Nanomater* 2011;2011:1–10. <https://doi.org/10.1155/2011/724153>.
154. Rogina A. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Appl Surf Sci* 2014;296:221–30. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.098>.
155. Zahmatkeshan M, Adel M, Bahrami S, Esmaeili F, Rezayat SM, Saeedi Y, et al. Polymer Based Nanofibers: Preparation, Fabrication, and Applications. In: Barhoum A, Bechelany M, Makhoulouf A, editors. *Handb. Nanofibers*, Cham: Springer International Publishing; 2018, p. 1–47. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42789-8_29-2.
156. Širc J, Hobzová R, Kostina N, Munzarová M, Juklíčková M, Lhotka M, et al. Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice. *J Nanomater* 2012;2012:327369. <https://doi.org/10.1155/2012/327369>.
157. Akhavan-Mahdavi S, Sadat Mirbagheri M. Perspective Chapter: Characterization Methods for Nanofibers. In: Shaheer Akhtar M, Kong I, Ameen S, editors. *Nanotechnol. Nanomater.*, vol. 7, IntechOpen; 2024. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1006179>.
158. Penczek PA. Resolution Measures in Molecular Electron Microscopy. *Methods Enzymol.*, vol. 482, Elsevier; 2010, p. 73–100. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)82003-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)82003-8).
159. Wang B, Liu W, Zhang M. Application of carbon-based adsorbents in the remediation of micro- and nanoplastics. *J Environ Manage* 2024;349:119522. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119522>.
160. Ko FK, Wan Y. *Introduction to Nanofiber Materials*. 1st ed. Cambridge University Press; 2014. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139021333>.
161. Webb J, Holgate JH. MICROSCOPY | Scanning Electron Microscopy. *Encycl. Food Sci. Nutr.*, Elsevier; 2003, p. 3922–8. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00779-3>.
162. Reneker DH, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996;7:216–23. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/7/3/009>.
163. Lopez Marquez A, Gareis IE, Dias FJ, Gerhard C, Lezcano MF. Methods to Characterize Electrospun Scaffold Morphology: A Critical Review. *Polymers* 2022;14:467. <https://doi.org/10.3390/polym14030467>.
164. Ali A, Zhang N, Santos RM. Mineral Characterization Using Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review of the Fundamentals, Advancements, and Research Directions. *Appl Sci* 2023;13:12600. <https://doi.org/10.3390/app132312600>.
165. Tanaka N. Present status and future prospects of spherical aberration corrected TEM/STEM for study of nanomaterials*. *Sci Technol Adv Mater* 2008;9:014111. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/9/1/014111>.

166. Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73886-2>.
167. Divinski S, Rösner H, Wilde G. Functional Nanostructured Materials – Microstructure, Thermodynamic Stability and Atomic Mobility. *Front. Nanosci.*, vol. 1, Elsevier; 2009, p. 1–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-044965-4.50004-3>.
168. Binnig G, Quate CF, Gerber Ch. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* 1986;56:930–3. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
169. Humphris ADL, Miles MJ, Hobbs JK. A mechanical microscope: High-speed atomic force microscopy. *Appl Phys Lett* 2005;86:034106. <https://doi.org/10.1063/1.1855407>.
170. Burgo ThiagoAL, Pereira GKR, Iglesias BA, Moreira KS, Valandro LF. AFM advanced modes for dental and biomedical applications. *J Mech Behav Biomed Mater* 2022;136:105475. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2022.105475>.
171. Enriques AE, Howard S, Timsina R, Khadka NK, Hoover AN, Ray AE, et al. Atomic Force Microscopy Cantilever-Based Nanoindentation: Mechanical Property Measurements at the Nanoscale in Air and Fluid. *J Vis Exp* 2022:64497. <https://doi.org/10.3791/64497>.
172. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Fiori C, Lifshin E. Electron-Beam-Specimen Interactions. *Scanning Electron Microsc. X-Ray Microanal.*, Boston, MA: Springer US; 1981, p. 53–122. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3273-2_3.
173. Jaggi N, Vij DR. FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY. In: Vij DR, editor. *Handb. Appl. Solid State Spectrosc.*, Boston, MA: Springer US; 2006, p. 411–50. https://doi.org/10.1007/0-387-37590-2_9.
174. Ozaki Y, Morita S, Du Y. Spectral Analysis. In: Ozaki Y, McClure WF, Christy AA, editors. *Near-Infrared Spectrosc. Food Sci. Technol.* 1st ed., Wiley; 2006, p. 47–72. <https://doi.org/10.1002/9780470047705.ch3>.
175. Neumann C, Mazzella WD. FORENSIC SCIENCES | Questioned Documents. *Encycl. Anal. Sci.*, Elsevier; 2005, p. 465–71. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00206-5>.
176. Han F, Wang J, Ding L, Hu Y, Li W, Yuan Z, et al. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:83. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00083>.
177. Origins. *Tissue Eng Part A* 2009;15:1449–50. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0412>.
178. Bouhadana G, Aljerian A, Thibaudeau S. The Reconstruction of Plastic Surgery: A Historical Perspective on the Etymology of Plastic and Reconstructive Surgery. *Plast Surg* 2023;31:366–70. <https://doi.org/10.1177/22925503211064377>.
179. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 2019;25:112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.
180. Matić A, Sher EK, Farhat EK, Sher F. Nanostructured Materials for Drug Delivery and Tissue Engineering Applications. *Mol Biotechnol* 2023. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00784-1>.
181. Chen F-M, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 2016;53:86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>.
182. Hsu S -h., Chen C-W. 3D bioprinting nerve. *3D Bioprinting Reconstr. Surg.*, Elsevier; 2018, p. 355–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101103-4.00016-8>.
183. Dzobo K, Thomford NE, Senthebane DA, Shipanga H, Rowe A, Dandara C, et al. Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. *Stem Cells Int* 2018;2018:1–24. <https://doi.org/10.1155/2018/2495848>.

184. Kumar V, Naqvi S, Gopinath P. Applications of Nanofibers in Tissue Engineering. Appl. Nanomater., Elsevier; 2018, p. 179–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101971-9.00008-9>.
185. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic Differentiation of Cultured Human Mesenchymal Stem Cells from Marrow. Tissue Eng 1998;4:415–28. <https://doi.org/10.1089/ten.1998.4.415>.
186. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends Biotechnol 2004;22:80–6. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001>.
187. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. Biomaterials 1999;20:573–88. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00209-9).
188. Rademakers T, Horvath JM, Blitterswijk CA, LaPointe VLS. Oxygen and nutrient delivery in tissue engineering: Approaches to graft vascularization. J Tissue Eng Regen Med 2019;13:1815–29. <https://doi.org/10.1002/term.2932>.
189. Zong X, Li S, Chen E, Garlick B, Kim K, Fang D, et al. Prevention of Postsurgery-Induced Abdominal Adhesions by Electrospun Bioabsorbable Nanofibrous Poly(lactide-co-glycolide)-Based Membranes. Ann Surg 2004;240:910–5. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000143302.48223.7e>.
190. Flores-Rojas GG, Gómez-Lazaro B, López-Saucedo F, Vera-Graziano R, Bucio E, Mendizábal E. Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering: A Review. Macromol 2023;3:524–53. <https://doi.org/10.3390/macromol3030031>.
191. Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. Int J Nanomedicine 2006;1:15–30. <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.1.15>.
192. Robinson JK, Anderson ER. Skin Structure and Surgical Anatomy. Surg. Skin, Elsevier; 2005, p. 3–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-02752-6.50006-7>.
193. Arda O, Göksüğü N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. Clin Dermatol 2014;32:3–13. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>.
194. Breitskreutz D, Koxholt I, Thiemann K, Nischt R. Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. BioMed Res Int 2013;2013:1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/179784>.
195. Pondeljak N, Lugović-Mihic L, Tomić L, Parać E, Pedić L, Lazić-Mosler E. Key Factors in the Complex and Coordinated Network of Skin Keratinization: Their Significance and Involvement in Common Skin Conditions. Int J Mol Sci 2023;25:236. <https://doi.org/10.3390/ijms25010236>.
196. Brody I. The ultrastructure of the tonofibrils in the keratinization process of normal human epidermis. J Ultrastruct Res 1960;4:264–97. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(60\)80023-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(60)80023-8).
197. Mistry DS, Chen Y, Sen GL. Progenitor Function in Self-Renewing Human Epidermis is Maintained by the Exosome. Cell Stem Cell 2012;11:127–35. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.022>.
198. Morrison KM, Miesegaes GR, Lumpkin EA, Maricich SM. Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. Dev Biol 2009;336:76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.09.032>.
199. Gartner LP, Hiatt JL. Color atlas of histology. 3rd ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
200. Ross MH, Pawlina W. Histology: a text and atlas ; with correlated cell and molecular biology. 6., international ed. Philadelphia, Pa. London: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

201. Prost-squarcioni C, Fraitag S, Heller M, Boehm N. Histologie fonctionnelle du derme. *Ann Dermatol Vénéréologie* 2008;135:5–20. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(08\)70206-0](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(08)70206-0).
202. Scott DW, Miller WH. Structure and Function of the Skin. *Equine Dermatol.*, Elsevier; 2003, p. 1–58. <https://doi.org/10.1016/B0-72-162571-1/50002-7>.
203. Carlson BM. Tissues. *Hum. Body*, Elsevier; 2019, p. 27–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804254-0.00002-8>.
204. Ibrahim AAE, Bagherani N, Smoller B, Bagherani N, Reyes-Barron C. Anatomy and Organization of Human Skin. In: Smoller B, Bagherani N, editors. *Atlas Dermatol. Dermatopathol. Venereol.*, Cham: Springer International Publishing; 2022, p. 109–32. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53811-2_3.
205. Turner NJ, Badylak SF. The Use of Biologic Scaffolds in the Treatment of Chronic Nonhealing Wounds. *Adv Wound Care* 2015;4:490–500. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0604>.
206. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:3861–85. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>.
207. Martin P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 1997;276:75–81. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.75>.
208. Brozovich FV, Nicholson CJ, Degen CV, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG, et al. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev* 2016;68:476–532. <https://doi.org/10.1124/pr.115.010652>.
209. Berridge BR, Van Vleet JF, Herman E. Cardiovascular System. *Fundam. Toxicol. Pathol.*, Elsevier; 2018, p. 153–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809841-7.00009-5>.
210. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res* 2022;387:391–8. <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2>.
211. Hwang DL, Latus LJ, Lev-Ran A. Effects of platelet-contained growth factors (PDGF, EGF, IGF-I, and TGF- β) on DNA synthesis in porcine aortic smooth muscle cells in culture. *Exp Cell Res* 1992;200:358–60. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90183-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90183-9).
212. Opneja A, Kapoor S, Stavrou EX. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb Res* 2019;179:56–63. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.05.001>.
213. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 2014;6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>.
214. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 2009;17:153–62. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x>.
215. Gonzalez ACDO, Costa TF, Andrade ZDA, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol* 2016;91:614–20. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.
216. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25:9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>.
217. Kleiser S, Nyström A. Interplay between Cell-Surface Receptors and Extracellular Matrix in Skin. *Biomolecules* 2020;10:1170. <https://doi.org/10.3390/biom10081170>.

218. Xue M, Jackson CJ. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care* 2015;4:119–36. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>.
219. Li B, Wang JH-C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. *J Tissue Viability* 2011;20:108–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2009.11.004>.
220. Hinz B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *J Invest Dermatol* 2007;127:526–37. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700613>.
221. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J Int Med Res* 2009;37:1528–42. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>.
222. Radzikowska-Büchner E, Łopuszyńska I, Flieger W, Tobiasz M, Maciejewski R, Flieger J. An Overview of Recent Developments in the Management of Burn Injuries. *Int J Mol Sci* 2023;24:16357. <https://doi.org/10.3390/ijms242216357>.
223. Dasari N, Jiang A, Skochdopole A, Chung J, Reece EM, Vorstenbosch J, et al. Updates in Diabetic Wound Healing, Inflammation, and Scarring. *Semin Plast Surg* 2021;35:153–8. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1731460>.
224. Kantar RS, Rifkin WJ, Wilson SC, David JA, Diaz-Siso JR, Levine JP, et al. Abdominal Panniculectomy: Determining the Impact of Diabetes on Complications and Risk Factors for Adverse Events. *Plast Reconstr Surg* 2018;142:462e–71e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000004732>.
225. Chi J, Wang M, Chen J, Hu L, Chen Z, Backman LJ, et al. Topographic Orientation of Scaffolds for Tissue Regeneration: Recent Advances in Biomaterial Design and Applications. *Biomimetics* 2022;7:131. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030131>.
226. Taye MM. Understanding of Machine Learning with Deep Learning: Architectures, Workflow, Applications and Future Directions. *Computers* 2023;12:91. <https://doi.org/10.3390/computers12050091>.
227. Alwateer M, Atlam E-S, El-Raouf MMA, Ghoneim OA, Gad I. Missing Data Imputation: A Comprehensive Review. *J Comput Commun* 2024;12:53–75. <https://doi.org/10.4236/jcc.2024.1211004>.
228. Bonferoni MC, Caramella C, Catenacci L, Conti B, Dorati R, Ferrari F, et al. Biomaterials for Soft Tissue Repair and Regeneration: A Focus on Italian Research in the Field. *Pharmaceutics* 2021;13:1341. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091341>.
229. EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. <https://www.eucast.org> (accessed February 8, 2024).
230. Balguid A, Mol A, Van Marion MH, Bank RA, Bouten CVC, Baaijens FPT. Tailoring Fiber Diameter in Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Scaffolds for Optimal Cellular Infiltration in Cardiovascular Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A* 2009;15:437–44. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0294>.
231. Jovanović M, Virijević K, Grujović M, Ćirić A, Petrović I, Arsenijević D, et al. *Armillaria ostoyae* extracts inhibit EMT of cancer cell lines via TGF- β and Wnt/ β -catenin signaling components. *Food Biosci* 2024;57:103250. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103250>.
232. Qu J, Zhao X, Liang Y, Zhang T, Ma PX, Guo B. Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. *Biomaterials* 2018;183:185–99. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.044>.

233. Chen D-R, Pui DYH, Kaufman SL. Electrospraying of conducting liquids for monodisperse aerosol generation in the 4 nm to 1.8 μ m diameter range. *J Aerosol Sci* 1995;26:963–77. [https://doi.org/10.1016/0021-8502\(95\)00027-A](https://doi.org/10.1016/0021-8502(95)00027-A).
234. Ge C, Zheng Y, Liu K, Xin B, Li M, All Amin Newton Md. The Formation Mechanism of Electrospun Beaded Fibers: Experiment and Simulation Study. *AATCC J Res* 2023;10:3–9. <https://doi.org/10.1177/24723444221132049>.
235. Gradinaru LM, Bercea M, Vlad S, Barbalata Mandru M, Drobota M, Aflori M, et al. Preparation and characterization of electrospun magnetic poly(ether urethane) nanocomposite mats: Relationships between the viscosity of the polymer solutions and the electrospinning ability. *Polymer* 2022;256:125186. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.125186>.
236. Rošić R, Pelipenko J, Kocbek P, Baumgartner S, Bešter-Rogač M, Kristl J. The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning. *Eur Polym J* 2012;48:1374–84. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.05.001>.
237. Andriotis OG, Nalbach M, Thurner PJ. Mechanics of isolated individual collagen fibrils. *Acta Biomater* 2023;163:35–49. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.12.008>.
238. A K, A L. Mechanical Behaviour of Skin: A Review. *J Mater Sci Eng* 2016;5. <https://doi.org/10.4172/2169-0022.1000254>.
239. Kalra A, Lowe A. An Overview of Factors Affecting the Skins Youngs Modulus. *J Aging Sci* 2016;4. <https://doi.org/10.4172/2329-8847.1000156>.
240. Pawlaczyk M, Lelonkiewicz M, Wieczorowski M. Age-dependent biomechanical properties of the skin. *Adv Dermatol Allergol* 2013;5:302–6. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.38359>.
241. Wanasekara N, Chen M, Chalivendra V, Bhowmick S. Investigation of the Young's Modulus of Fibers in an Electrospun PCL Scaffold Using AFM and its Correlation to cell Attachment. In: Proulx T, editor. *MEMS Nanotechnol*. Vol. 2, New York, NY: Springer New York; 2011, p. 157–62. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8825-6_22.
242. Kim S, Lee Y, Lee M, An S, Cho S-J. Quantitative Visualization of the Nanomechanical Young's Modulus of Soft Materials by Atomic Force Microscopy. *Nanomaterials* 2021;11:1593. <https://doi.org/10.3390/nano11061593>.
243. Lee J, Deng Y. Nanoindentation study of individual cellulose nanowhisker-reinforced PVA electrospun fiber. *Polym Bull* 2013;70:1205–19. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0842-7>.
244. Zussman E, Burman M, Yarin AL, Khalfin R, Cohen Y. Tensile deformation of electrospun nylon-6,6 nanofibers. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2006;44:1482–9. <https://doi.org/10.1002/polb.20803>.
245. Rajasekaran R, Dutta A, Ray PG, Seesala VS, Ojha AK, Dogra N, et al. High fibroin-loaded silk-PCL electrospun fiber with core-shell morphology promotes epithelialization with accelerated wound healing. *J Mater Chem B* 2022;10:9622–38. <https://doi.org/10.1039/D2TB01890J>.
246. Rath G, Hussain T, Chauhan G, Garg T, Goyal AK. Collagen nanofiber containing silver nanoparticles for improved wound-healing applications. *J Drug Target* 2016;24:520–9. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1095922>.
247. He J, Liang Y, Shi M, Guo B. Anti-oxidant electroactive and antibacterial nanofibrous wound dressings based on poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan-graft-polyaniline for full-thickness skin wound healing. *Chem Eng J* 2020;385:123464. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123464>.
248. Seyfollahi M, Etemadi H, Yegani R, Rabeii M, Shokri E. The effect of polyethylene glycol grafted nanodiamond on antifouling properties of cellulose acetate membrane for

- Removal of BSA from Contaminated Water. *J Water Environ Nanotechnol* 2019;4. <https://doi.org/10.22090/jwent.2019.01.001>.
249. Jain S, Bajpai AK. Designing polyethylene glycol (PEG) – plasticized membranes of poly(vinyl alcohol-g-methyl methacrylate) and investigation of water sorption and blood compatibility behaviors. *Des Monomers Polym* 2013;16:436–46. <https://doi.org/10.1080/15685551.2012.747162>.
 250. Cai S, Wu C, Yang W, Liang W, Yu H, Liu L. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. *Nanotechnol Rev* 2020;9:971–89. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2020-0076>.
 251. Xin AX, Gaydos C, Mao JJ. In vitro Degradation Behavior of Photopolymerized PEG Hydrogels as Tissue Engineering Scaffold. 2006 Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc., New York, NY: IEEE; 2006, p. 2091–3. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2006.260811>.
 252. Kupka V, Dvořáková E, Manakhov A, Michlíček M, Petruš J, Vojtová L, et al. Well-Blended PCL/PEO Electrospun Nanofibers with Functional Properties Enhanced by Plasma Processing. *Polymers* 2020;12:1403. <https://doi.org/10.3390/polym12061403>.
 253. Athanasoulia II, Christoforidis MN, Korres DM, Tarantili PA. The effect of poly(ethylene glycol) mixed with poly(L -lactic acid) on the crystallization characteristics and properties of their blends. *Polym Int* 2019;68:788–804. <https://doi.org/10.1002/pi.5769>.
 254. Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 2008;49:5603–21. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.09.014>.
 255. Nezari S, Sarli M, Hivechi A, Bahrami H, Milan PB, Latifi N, et al. Investigating the effect of poly(ε-caprolactone) nanofibers scaffolds with random, unidirectionally, and radially aligned morphologies on the Fibroblast cell's attachment and growth behavior. *Turk J Chem* 2023;47:54–62. <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3516>.
 256. Franco RA, Nguyen TH, Lee B-T. Preparation and characterization of electrospun PCL/PLGA membranes and chitosan/gelatin hydrogels for skin bioengineering applications. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:2207–18. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4402-8>.
 257. Bui HT, Chung OH, Dela Cruz J, Park JS. Fabrication and characterization of electrospun curcumin-loaded polycaprolactone-polyethylene glycol nanofibers for enhanced wound healing. *Macromol Res* 2014;22:1288–96. <https://doi.org/10.1007/s13233-014-2179-6>.
 258. Oztemur J, Ozdemir S, Tezcan-Unlu H, Cecener G, Sezgin H, Yalcin-Enis I. Investigation of biodegradability and cellular activity of PCL/PLA and PCL/PLLA electrospun webs for tissue engineering applications. *Biopolymers* 2023;114:e23564. <https://doi.org/10.1002/bip.23564>.
 259. Torres-Giner S, Martinez-Abad A, Gimeno-Alcañiz JV, Ocio MJ, Lagaron JM. Controlled Delivery of Gentamicin Antibiotic from Bioactive Electrospun Polylactide-Based Ultrathin Fibers. *Adv Eng Mater* 2012;14. <https://doi.org/10.1002/adem.201180006>.
 260. Trautmann M, Brückner O, Marre R, Hahn H. Comparative efficacy of ciprofloxacin, ceftazidime and gentamicin, given alone or in combination, in a model of experimental septicemia due to *klebsiella pneumoniae* in neutropenic mice. *Infection* 1988;16:49–53. <https://doi.org/10.1007/BF01646933>.
 261. Spencer AC, Panda SS. DNA Gyrase as a Target for Quinolones. *Biomedicines* 2023;11:371. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020371>.

262. Finland M, Garner C, Wilcox C, Sabath LD. Susceptibility of *Pneumococci* and *Haemophilus influenzae* to Antibacterial Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1976;9:274–87. <https://doi.org/10.1128/AAC.9.2.274>.
263. Kadry AA, Fouda SI, Elkhizzi NA, Shibl AM. Correlation between susceptibility and BRO type enzyme of *Moraxella catarrhalis* strains. *Int J Antimicrob Agents* 2003;22:532–6. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00158-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00158-4).
264. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
265. Khanmohammadi S, Karimian R, Ghanbari Mehrabani M, Mehramuz B, Ganbarov K, Ejlali L, et al. Poly (ϵ -Caprolactone)/Cellulose Nanofiber Blend Nanocomposites Containing ZrO₂ Nanoparticles: A New Biocompatible Wound Dressing Bandage with Antimicrobial Activity. *Adv Pharm Bull* 2020;10:577–85. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.069>.
266. Li R, Cheng Z, Yu X, Wang S, Han Z, Kang L. Preparation of antibacterial PCL/PVP-AgNP Janus nanofibers by uniaxial electrospinning. *Mater Lett* 2019;254:206–9. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.07.075>.
267. Roopesh M, Davis D, Jyothi MS, Vandana M, Thippeswamy BS, Hegde G, et al. Wound healing efficacy of curcumin-loaded sandalwood bark-derived carbon nanosphere/PVA nanofiber matrix. *RSC Adv* 2023;13:24320–30. <https://doi.org/10.1039/D3RA04181F>.
268. Karuppannan SK, Bushion J, Ramalingam R, Swaminathan S, Arunachalam KD, Kadam AA, et al. Fabrication, characterization and in vitro evaluation of *Melia dubia* extract infused nanofibers for wound dressing. *J King Saud Univ - Sci* 2022;34:101931. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101931>.
269. Hussein Y, El-Fakharany EM, Kamoun EA, Loutfy SA, Amin R, Taha TH, et al. Electrospun PVA/hyaluronic acid/L-arginine nanofibers for wound healing applications: Nanofibers optimization and in vitro bioevaluation. *Int J Biol Macromol* 2020;164:667–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.126>.
270. Ahmed M, Ramos T, Wieringa P, Blitterswijk CV, Boer JD, Moroni L. Geometric constraints of endothelial cell migration on electrospun fibres. *Sci Rep* 2018;8:6386. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24667-7>.
271. Fischer D, Fluegen G, Garcia P, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Gribaldo L, Huang RY-J, et al. The CAM Model—Q&A with Experts. *Cancers* 2022;15:191. <https://doi.org/10.3390/cancers15010191>.
272. Masson-Meyers DS, Tayebi L. Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. *J Tissue Eng Regen Med* 2021;15:747–62. <https://doi.org/10.1002/term.3225>.
273. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol* 2012;30:546–54. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>.
274. Rameshbabu AP, Datta S, Bankoti K, Subramani E, Chaudhury K, Lalzawmliana V, et al. Polycaprolactone nanofibers functionalized with placental derived extracellular matrix for stimulating wound healing activity. *J Mater Chem B* 2018;6:6767–80. <https://doi.org/10.1039/C8TB01373J>.
275. Williamson M, Black R, Kielty C. PCL–PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: Attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells. *Biomaterials* 2006;S014296120600161X. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.025>.

276. Reys LL, Silva SS, Oliveira C, Neves NM, Martins A, Reis RL, et al. Angiogenic potential of airbrushed fucoidan/polycaprolactone nanofibrous meshes. *Int J Biol Macromol* 2021;183:695–706. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.166>.
277. Buganza Tepole A, Kuhl E. Systems-based approaches toward wound healing. *Pediatr Res* 2013;73:553–63. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.3>.
278. Bölgen N, Vargel İ, Korkusuz P, Menceloğlu YZ, Pişkin E. *In vivo* performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;81B:530–43. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30694>.
279. Anand S, Rajinikanth PS, Arya DK, Pandey P, Gupta RK, Sankhwar R, et al. Multifunctional Biomimetic Nanofibrous Scaffold Loaded with Asiaticoside for Rapid Diabetic Wound Healing. *Pharmaceutics* 2022;14:273. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020273>.
280. Almasi L, Arkan E, Farzaei MH, Iranpanah A, Jalili C, Abbaszadeh F, et al. Preparation of *Tragopogon graminifolius*-loaded electrospun nanofibers and evaluating its wound healing activity in a rat model of skin scar. *Front Pharmacol* 2025;16:1533010. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1533010>.
281. Campiglio CE, Contessi Negrini N, Farè S, Draghi L. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials* 2019;12:2476. <https://doi.org/10.3390/ma12152476>.
282. Chen W, Gao Z, He M, Dou Y, Yin G, Ding J. Vapor-phase glutaraldehyde crosslinked waste protein-based nanofiber nonwovens as an environmentally friendly wound dressing. *React Funct Polym* 2022;172:105203. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105203>.
283. Anjum S, Rahman F, Pandey P, Arya DK, Alam M, Rajinikanth PS, et al. Electrospun Biomimetic Nanofibrous Scaffolds: A Promising Prospect for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci* 2022;23:9206. <https://doi.org/10.3390/ijms23169206>.
284. Banafati Zadeh F, Zamanian A. Glutaraldehyde: Introducing Optimum Condition for Cross-linking the Chitosan/Gelatin Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Int J Eng* 2022;35:1967–80. <https://doi.org/10.5829/IJE.2022.35.10A.15>.
285. Avossa J, Herwig G, Toncelli C, Itel F, Rossi RM. Electrospinning based on benign solvents: current definitions, implications and strategies. *Green Chem* 2022;24:2347–75. <https://doi.org/10.1039/D1GC04252A>.
286. Chi HY, Chang NY, Li C, Chan V, Hsieh JH, Tsai Y-H, et al. Fabrication of Gelatin Nanofibers by Electrospinning—Mixture of Gelatin and Polyvinyl Alcohol. *Polymers* 2022;14:2610. <https://doi.org/10.3390/polym14132610>.
287. Abdulkadhim MK, Habeeb SA. Electro spun uniform nanofiber from gelatin: Chitosan at low Concentration. *Mater Today Proc* 2023;87:299–306. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.06.047>.
288. Erencia M, Cano F, Tornero JA, Fernandes MM, Tzanov T, Macanás J, et al. Electrospinning of gelatin fibers using solutions with low acetic acid concentration: Effect of solvent composition on both diameter of electrospun fibers and cytotoxicity. *J Appl Polym Sci* 2015;132:app.42115. <https://doi.org/10.1002/app.42115>.
289. Binulal NS, Natarajan A, Menon D, Bhaskaran VK, Mony U, Nair SV. PCL–gelatin composite nanofibers electrospun using diluted acetic acid–ethyl acetate solvent system for stem cell-based bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 2014;25:325–40. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.859872>.

290. Jalaja K, James NR. Electrospun gelatin nanofibers: A facile cross-linking approach using oxidized sucrose. *Int J Biol Macromol* 2015;73:270–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.018>.
291. Ajmal G, Bonde GV, Mittal P, Khan G, Pandey VK, Bakade BV, et al. Biomimetic PCL-gelatin based nanofibers loaded with ciprofloxacin hydrochloride and quercetin: A potential antibacterial and anti-oxidant dressing material for accelerated healing of a full thickness wound. *Int J Pharm* 2019;567:118480. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118480>.
292. Cesur S, Ilhan E, Tut TA, Kaya E, Dalbayrak B, Bosgelmez-Tinaz G, et al. Design of Cinnamaldehyde- and Gentamicin-Loaded Double-Layer Corneal Nanofiber Patches with Antibiofilm and Antimicrobial Effects. *ACS Omega* 2023;8:28109–21. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00914>.
293. Baykara D, Pilavci E, Cesur S, Ilhan E, Ulag S, Sengor M, et al. Controlled Release of Gentamicin from Electrospun Poly(Vinyl Alcohol)/Gelatin Nanofibers: The Effect of Crosslinking Time Using Glutaraldehyde Vapor. *ChemistrySelect* 2023;8:e202203681. <https://doi.org/10.1002/slct.202203681>.
294. Liu Y, Wang X, Hu F, Rausch-Fan X, Steinberg T, Lan Z, et al. The effect of modifying the nanostructure of gelatin fiber scaffolds on early angiogenesis in vitro and in vivo. *Biomed Mater* 2022;17:015010. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac3c3c>.
295. Lu W, Ma M, Xu H, Zhang B, Cao X, Guo Y. Gelatin nanofibers prepared by spiral-electrospinning and cross-linked by vapor and liquid-phase glutaraldehyde. *Mater Lett* 2015;140:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.10.146>.
296. Pal A, Kumar Bajpai A, Bajpai J. Study on facile designing, swelling properties and structural relationship of gelatin nanoparticles. *J Macromol Sci Part A* 2019;56:206–14. <https://doi.org/10.1080/10601325.2019.1565542>.
297. Lin J, Pan D, Sun Y, Ou C, Wang Y, Cao J. The modification of gelatin films: Based on various cross-linking mechanism of glutaraldehyde at acidic and alkaline conditions. *Food Sci Nutr* 2019;7:4140–6. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1282>.
298. Dwivedi C, Pandey H, Pandey A, Ramteke P. Fabrication and Assessment of Gentamicin Loaded Electrospun Nanofibrous Scaffolds as a Quick Wound Healing Dressing Material. *Curr Nanosci* 2015;11:222–8. <https://doi.org/10.2174/1573413710666141003221954>.
299. Silva DM, Vyas HKN, Sanderson-Smith ML, Sencadas V. Development and optimization of ciprofloxacin-loaded gelatin microparticles by single-step spray-drying technique. *Powder Technol* 2018;330:201–9. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.02.029>.
300. Cui C, Sun S, Li X, Chen S, Wu S, Zhou F, et al. Optimizing the chitosan-PCL based membranes with random/aligned fiber structure for controlled ciprofloxacin delivery and wound healing. *Int J Biol Macromol* 2022;205:500–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.118>.
301. Lin M, Liu Y, Gao J, Wang D, Xia D, Liang C, et al. Synergistic Effect of Co-Delivering Ciprofloxacin and Tetracycline Hydrochloride for Promoted Wound Healing by Utilizing Coaxial PCL/Gelatin Nanofiber Membrane. *Int J Mol Sci* 2022;23:1895. <https://doi.org/10.3390/ijms23031895>.
302. Zhan J, Morsi Y, Ei-Hamshary H, Al-Deyab SS, Mo X. In vitro evaluation of electrospun gelatin–glutaraldehyde nanofibers. *Front Mater Sci* 2016;10:90–100. <https://doi.org/10.1007/s11706-016-0329-9>.
303. Liang Y, Liang Y, Zhang H, Guo B. Antibacterial biomaterials for skin wound dressing. *Asian J Pharm Sci* 2022;17:353–84. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.01.001>.

304. Gautam S, Dinda AK, Mishra NC. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Mater Sci Eng C* 2013;33:1228–35. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.015>.
305. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* 2001;22:763–8. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00236-2).
306. Madkhali OA. Drug Delivery of Gelatin Nanoparticles as a Biodegradable Polymer for the Treatment of Infectious Diseases: Perspectives and Challenges. *Polymers* 2023;15:4327. <https://doi.org/10.3390/polym15214327>.
307. Thairin T, Wutticharoenmongkol P. Ciprofloxacin-loaded alginate/poly (vinyl alcohol)/gelatin electrospun nanofiber mats as antibacterial wound dressings. *J Ind Text* 2022;51:1296S–1322S. <https://doi.org/10.1177/1528083721997466>.
308. Salimi F, Mohammadipanah F. Nanomaterials Versus The Microbial Compounds With Wound Healing Property. *Front Nanotechnol* 2021;2:584489. <https://doi.org/10.3389/fnano.2020.584489>.
309. Advancements in Gelatin-Based Wound Dressings: Cross-Linking Techniques, Biocompatibility, and Biodegradability for Enhanced Angiogenesis and Healing. *J Angiother* 2024;8. <https://doi.org/10.25163/angiotherapy.81110011>.
310. Deng Y, Xie J, Xiao J, Huang X, Cao Z. Gelatin methacryloyl hydrogel encapsulating molybdenum-inspired macrophage-derived exosomes accelerates wound healing via immune regulation and angiogenesis. *Int J Biol Macromol* 2025;291:138947. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138947>.
311. Dreesmann L, Ahlers M, Schlosshauer B. The pro-angiogenic characteristics of a cross-linked gelatin matrix. *Biomaterials* 2007;28:5536–43. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.040>.
312. Rademakers T, Horvath JM, Blitterswijk CA, LaPointe VLS. Oxygen and nutrient delivery in tissue engineering: Approaches to graft vascularization. *J Tissue Eng Regen Med* 2019;13:1815–29. <https://doi.org/10.1002/term.2932>.
313. Claaßen C, Dannecker M, Grübel J, Kotzampasi M-E, Tovar GEM, Stanzel BV, et al. The choice of biopolymer is crucial to trigger angiogenesis with vascular endothelial growth factor releasing coatings. *J Mater Sci Mater Med* 2020;31:93. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06424-3>.
314. Nazarnezhad S, Baine F, Kim H-W, Webster TJ, Kargozar S. Electrospun Nanofibers for Improved Angiogenesis: Promises for Tissue Engineering Applications. *Nanomaterials* 2020;10:1609. <https://doi.org/10.3390/nano10081609>.
315. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res* 2009;153:347–58. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>.
316. Ren X, Zhao M, Lash B, Martino MM, Julier Z. Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;7:469. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00469>.
317. Negut I, Dorcioman G, Grumezescu V. Scaffolds for Wound Healing Applications. *Polymers* 2020;12:2010. <https://doi.org/10.3390/polym12092010>.
318. Hashemikia S, Farhangpazhouh F, Parsa M, Hasan M, Hassanzadeh A, Hamidi M. Fabrication of ciprofloxacin-loaded chitosan/polyethylene oxide/silica nanofibers for wound dressing application: In vitro and in vivo evaluations. *Int J Pharm* 2021;597:120313. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120313>.

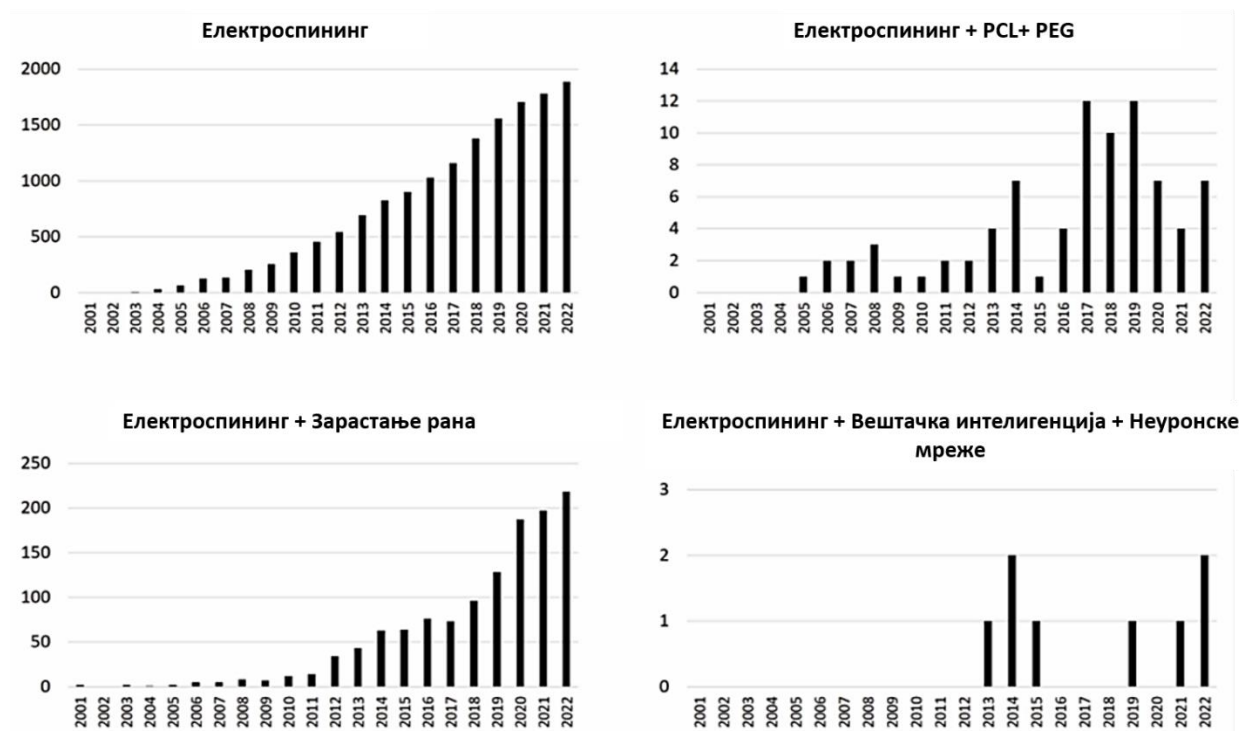
319. Li H, Williams GR, Wu J, Lv Y, Sun X, Wu H, et al. Thermosensitive nanofibers loaded with ciprofloxacin as antibacterial wound dressing materials. *Int J Pharm* 2017;517:135–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.008>.
320. Stevanović M, Djošić M, Janković A, Nešović K, Kojić V, Stojanović J, et al. Assessing the Bioactivity of Gentamicin-Preloaded Hydroxyapatite/Chitosan Composite Coating on Titanium Substrate. *ACS Omega* 2020;5:15433–45. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01583>.
321. Mosallanezhad P, Nazockdast H, Ahmadi Z, Rostami A. Fabrication and characterization of polycaprolactone/chitosan nanofibers containing antibacterial agents of curcumin and ZnO nanoparticles for use as wound dressing. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:1027351. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1027351>.
322. Shen X, Yu D, Zhu L, Branford-White C, White K, Chatterton NP. Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit® L 100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery. *Int J Pharm* 2011;408:200–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.058>.
323. Mira A, Sainz-Urruela C, Codina H, Jenkins SI, Rodriguez-Diaz JC, Mallavia R, et al. Physico-Chemically Distinct Nanomaterials Synthesized from Derivates of a Poly(Anhydride) Diversify the Spectrum of Loadable Antibiotics. *Nanomaterials* 2020;10:486. <https://doi.org/10.3390/nano10030486>.
324. Teixeira MO, Marinho E, Silva C, Antunes JC, Felgueiras HP. Pullulan hydrogels as drug release platforms in biomedicine. *J Drug Deliv Sci Technol* 2023;89:105066. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105066>.
325. Hawthorne D, Pannala A, Sandeman S, Lloyd A. Sustained and targeted delivery of hydrophilic drug compounds: A review of existing and novel technologies from bench to bedside. *J Drug Deliv Sci Technol* 2022;78:103936. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103936>.
326. Bārzdīņa A, Plotniece A, Sobolev A, Pajuste K, Bandere D, Brangule A. From Polymeric Nanoformulations to Polyphenols—Strategies for Enhancing the Efficacy and Drug Delivery of Gentamicin. *Antibiotics* 2024;13:305. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13040305>.
327. Siqueira NM, Garcia KC, Bussamara R, Both FS, Vainstein MH, Soares RMD. Poly (lactic acid)/chitosan fiber mats: Investigation of effects of the support on lipase immobilization. *Int J Biol Macromol* 2015;72:998–1004. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.048>.
328. Narvaez-Flores J, Vilar-Pineda G, Acosta-Torres L, Garcia-Contreras R. Cytotoxic and anti-inflammatory effects of chitosan and hemostatic gelatin in oral cell culture. *Acta Odontológica Latinoam* 2021;34:98–103. <https://doi.org/10.54589/aol.34/2/098>.
329. Asadzadeh F, Ghorbanzadeh S, Poursattar Marjani A, Gholami R, Asadzadeh F, Lotfollahi L. Assessing polylactic acid nanofibers with cellulose and chitosan nanocapsules loaded with chamomile extract for treating gram-negative infections. *Sci Rep* 2024;14:22336. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72398-9>.
330. Chen DW-C, Liu S-J. Nanofibers Used for Delivery of Antimicrobial Agents. *Nanomed* 2015;10:1959–71. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.28>.
331. Fisher LM, Lawrence JM, Josty IC, Hopewell R, Margerrison EEC, Cullen ME. Ciprofloxacin and the fluoroquinolones. *Am J Med* 1989;87:S2–8. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(89\)90010-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(89)90010-7).
332. Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3249–56. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000>.
333. Wang T, Ji X, Jin L, Feng Z, Wu J, Zheng J, et al. Fabrication and Characterization of Heparin-Grafted Poly- L -lactic acid–Chitosan Core–Shell Nanofibers Scaffold for

- Vascular Gasket. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013;5:3757–63. <https://doi.org/10.1021/am400369c>.
334. Rabea EI, Badawy ME-T, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules* 2003;4:1457–65. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>.
 335. Hardiansyah A, Tanadi H, Yang M-C, Liu T-Y. Electrospinning and antibacterial activity of chitosan-blended poly(lactic acid) nanofibers. *J Polym Res* 2015;22:59. <https://doi.org/10.1007/s10965-015-0704-8>.
 336. Cui W, Zhu X, Yang Y, Li X, Jin Y. Evaluation of electrospun fibrous scaffolds of poly(dl-lactide) and poly(ethylene glycol) for skin tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 2009;29:1869–76. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.02.013>.
 337. Alaraby M, Abass D, Farre M, Hernández A, Marcos R. Are bioplastics safe? Hazardous effects of polylactic acid (PLA) nanoplastics in *Drosophila*. *Sci Total Environ* 2024;919:170592. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170592>.
 338. Samokhin Y, Varava Y, Diedkova K, Yanko I, Korniienko V, Husak Y, et al. Electrospun Chitosan/Polylactic Acid Nanofibers with Silver Nanoparticles: Structure, Antibacterial, and Cytotoxic Properties. *ACS Appl Bio Mater* 2025;8:1027–37. <https://doi.org/10.1021/acsabm.4c01252>.
 339. Li J, Cai C, Li J, Li J, Li J, Sun T, et al. Chitosan-Based Nanomaterials for Drug Delivery. *Molecules* 2018;23:2661. <https://doi.org/10.3390/molecules23102661>.
 340. Suryanegara L, Fatriasari W, Zulfiana D, Anita SH, Masruchin N, Gutari S, et al. Novel antimicrobial bioplastic based on PLA-chitosan by addition of TiO₂ and ZnO. *J Environ Health Sci Eng* 2021;19:415–25. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00614-z>.
 341. Hochvaldová L, Večeřová R, Kolář M, Pucek R, Kvítek L, Lapčík L, et al. Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis. *Nanotechnol Rev* 2022;11:1115–42. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0059>.
 342. Chakraborty N, Jha D, Roy I, Kumar P, Gaurav SS, Marimuthu K, et al. Nanobiotics against antimicrobial resistance: harnessing the power of nanoscale materials and technologies. *J Nanobiotechnology* 2022;20:375. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01573-9>.
 343. Qadeer A, Khan A, Khan NM, Wajid A, Ullah K, Skalickova S, et al. Use of nanotechnology-based nanomaterial as a substitute for antibiotics in monogastric animals. *Heliyon* 2024;10:e31728. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31728>.
 344. Yang S, Zhang X, Zhang D. Electrospun Chitosan/Poly (Vinyl Alcohol)/Graphene Oxide Nanofibrous Membrane with Ciprofloxacin Antibiotic Drug for Potential Wound Dressing Application. *Int J Mol Sci* 2019;20:4395. <https://doi.org/10.3390/ijms20184395>.
 345. Prabakaran M, Mano JF. Chitosan-Based Particles as Controlled Drug Delivery Systems. *Drug Deliv* 2004;12:41–57. <https://doi.org/10.1080/10717540590889781>.
 346. Yadav V, Talwar P. Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth. *Biomed Pharmacother* 2019;111:934–46. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.119>.
 347. Jahani M, Asefnejad A, Al-Musawi MH, Mohammed AA, Al-Sudani BT, Hameed Al-bahrani M, et al. Antibacterial and wound healing stimulant nanofibrous dressing consisting of soluplus and soy protein isolate loaded with mupirocin. *Sci Rep* 2024;14:26397. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-78161-4>.
 348. Parham S, Kharazi AZ, Bakhsheshi-Rad HR, Kharaziha M, Ismail AF, Sharif S, et al. Antimicrobial Synthetic and Natural Polymeric Nanofibers as Wound Dressing: A Review. *Adv Eng Mater* 2022;24:2101460. <https://doi.org/10.1002/adem.202101460>.

349. Boschetto F, Ngoc Doan H, Phong Vo P, Zanooco M, Zhu W, Sakai W, et al. Antibacterial and Osteoconductive Effects of Chitosan/Polyethylene Oxide (PEO)/Bioactive Glass Nanofibers for Orthopedic Applications. *Appl Sci* 2020;10:2360. <https://doi.org/10.3390/app10072360>.
350. Fahimirad S, Satei P, Ganji A, Abtahi H. Wound healing capability of the double-layer Polycaprolactone/Polyvinyl alcohol-Chitosan lactate electrospun nanofiber incorporating Echinacea purpurea extract. *J Drug Deliv Sci Technol* 2023;87:104734. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104734>.
351. Khazaeli P, Alaei M, Khaksarihadad M, Ranjbar M. Preparation of PLA/chitosan nanoscaffolds containing cod liver oil and experimental diabetic wound healing in male rats study. *J Nanobiotechnology* 2020;18:176. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00737-9>.
352. Milanesi G, Vigani B, Rossi S, Sandri G, Mele E. Chitosan-Coated Poly(lactic acid) Nanofibres Loaded with Essential Oils for Wound Healing. *Polymers* 2021;13:2582. <https://doi.org/10.3390/polym13162582>.

Прилози

Прилог А. Статистичка анализа и примена вештачке интелигенције



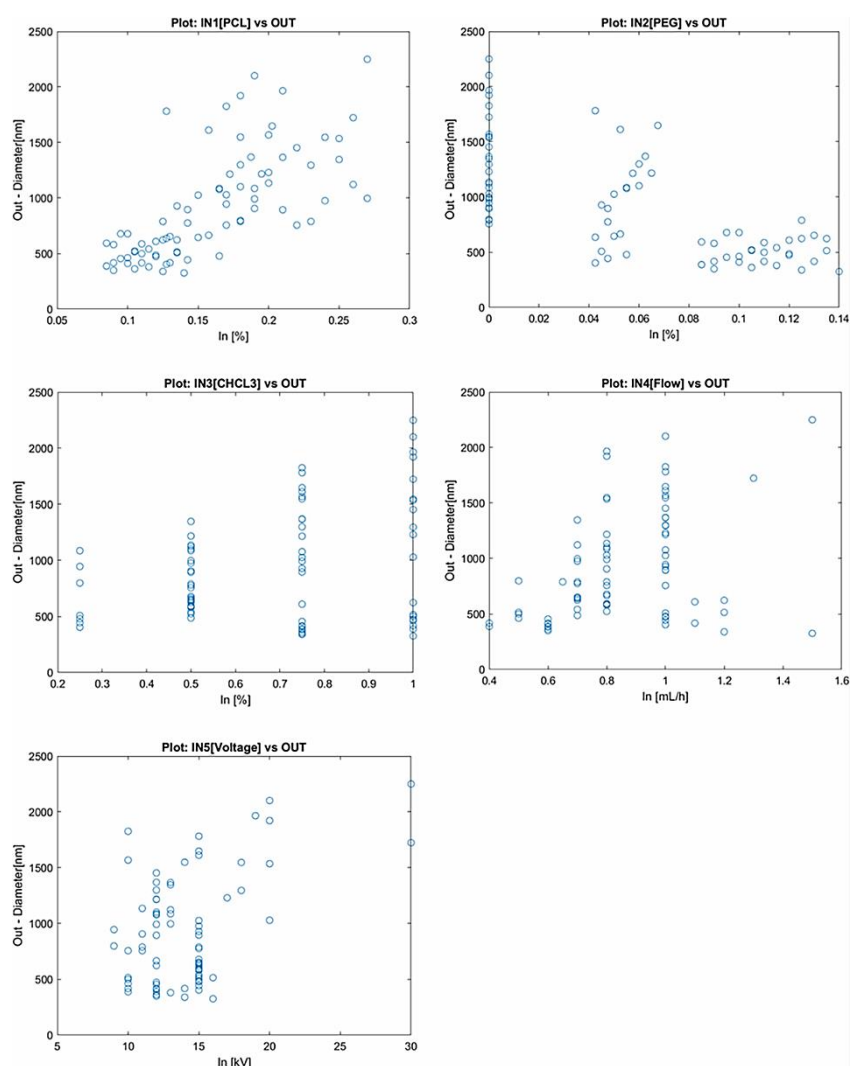
Слика 1П. Трендови објављених научних радова у периоду од 2001-2022. у оквиру истраживачких области означених кључним речима: „Електроспининг“, „Електроспининг + PCL + PEG“, „Електроспининг + зарастање рана“ и „Електроспининг + вештачка интелигенција + неуронска мрежа“.

Кључне речи	Број научних радова 2001-2022
Електроспининг + AI + NN + Зарастање рана	0
Електроспининг + AI + NN + PCL	2
Електроспининг + AI + NN + PEG	0
Електроспининг + AI + NN + PCL + PEG	0
Електроспининг + Зарастање рана + PCL	228
Електроспининг + Зарастање рана + PEG	23
Електроспининг + Зарастање рана + PCL + PEG	7

Табела 1П. Број објављених научних радова у зависности од области истраживања у периоду 2001-2022.

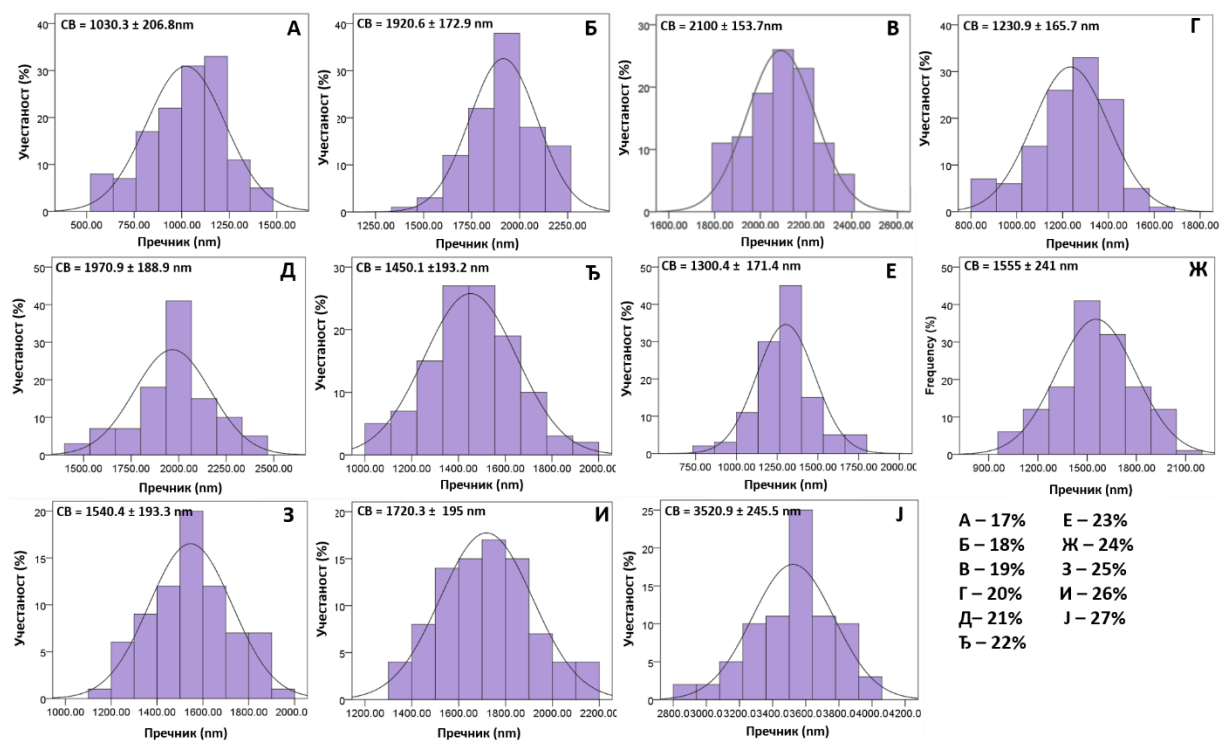
PCL	PEG	CHCL ₃	DMF	Проток [ml/h]	Напон [kV]	Пречник[nm]
0.1700	0	1	0	0.800	20	1029
0.1800	0	1	0	0.750	15	890
...	...	...	...	...	...	...

Табела 2П. Улазни подаци структурирани за вештачку неуронску мрежу (ANN) – формат CSV датотеке.

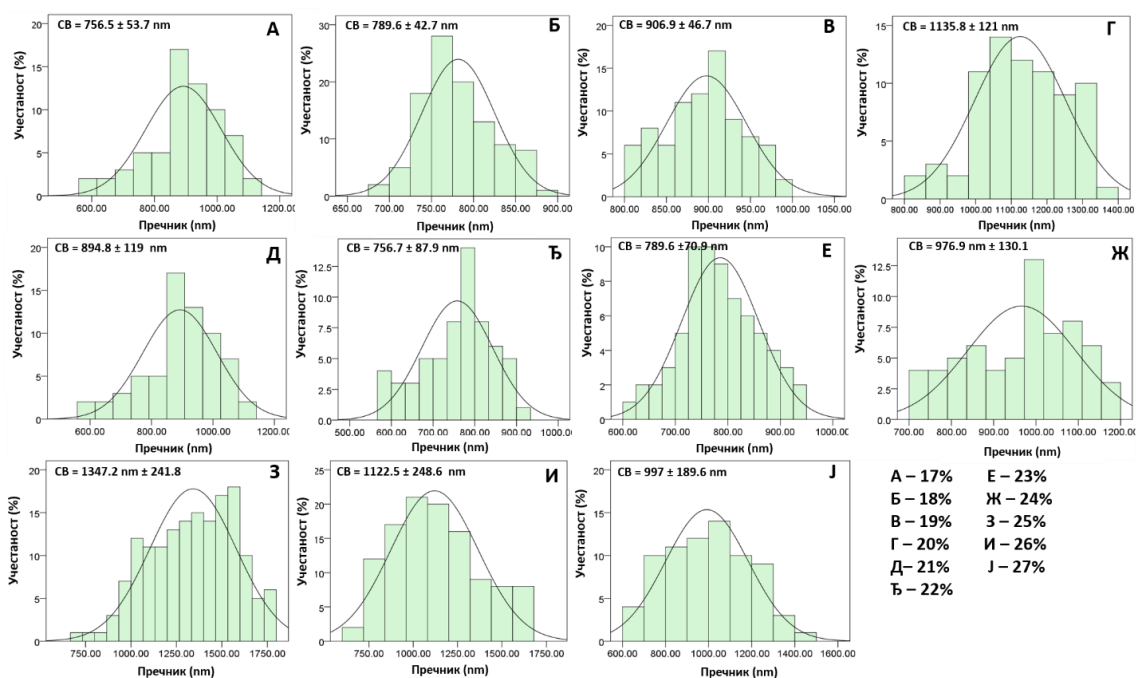


Слика 2П. Основна визуелизација зависности излазних података (вертикална оса) од појединачних улазних променљивих података (хоризонтална оса).

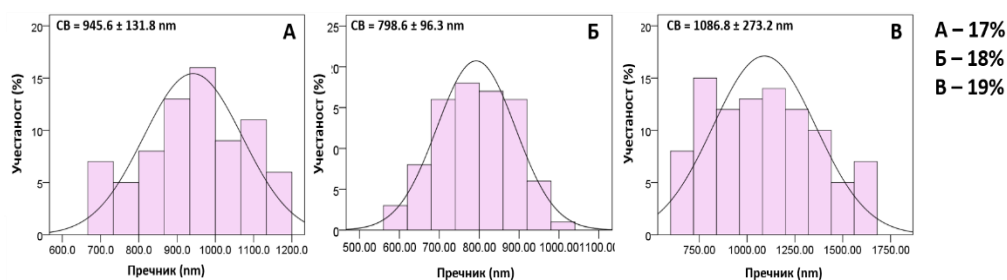
Прилог Б. Морфолошка дистрибуција влакана у зависности од примењених хемијских параметара раствора



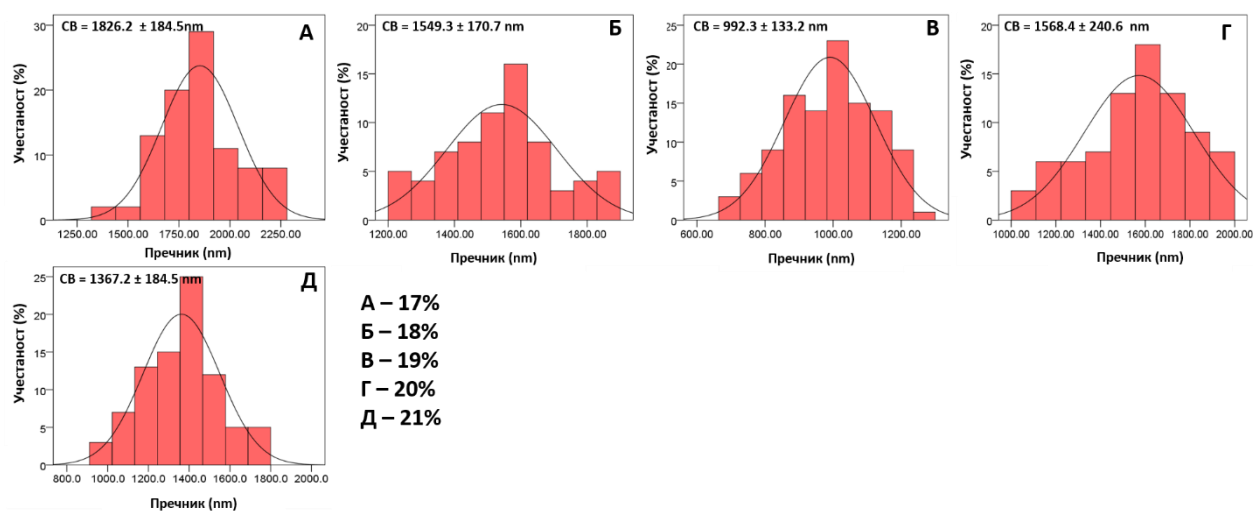
Слика 3П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 1: PCL у CHCl_3 . А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ђ) 22% Е) 23% Ж) 24% З) 25% И) 26% Ј) 27%



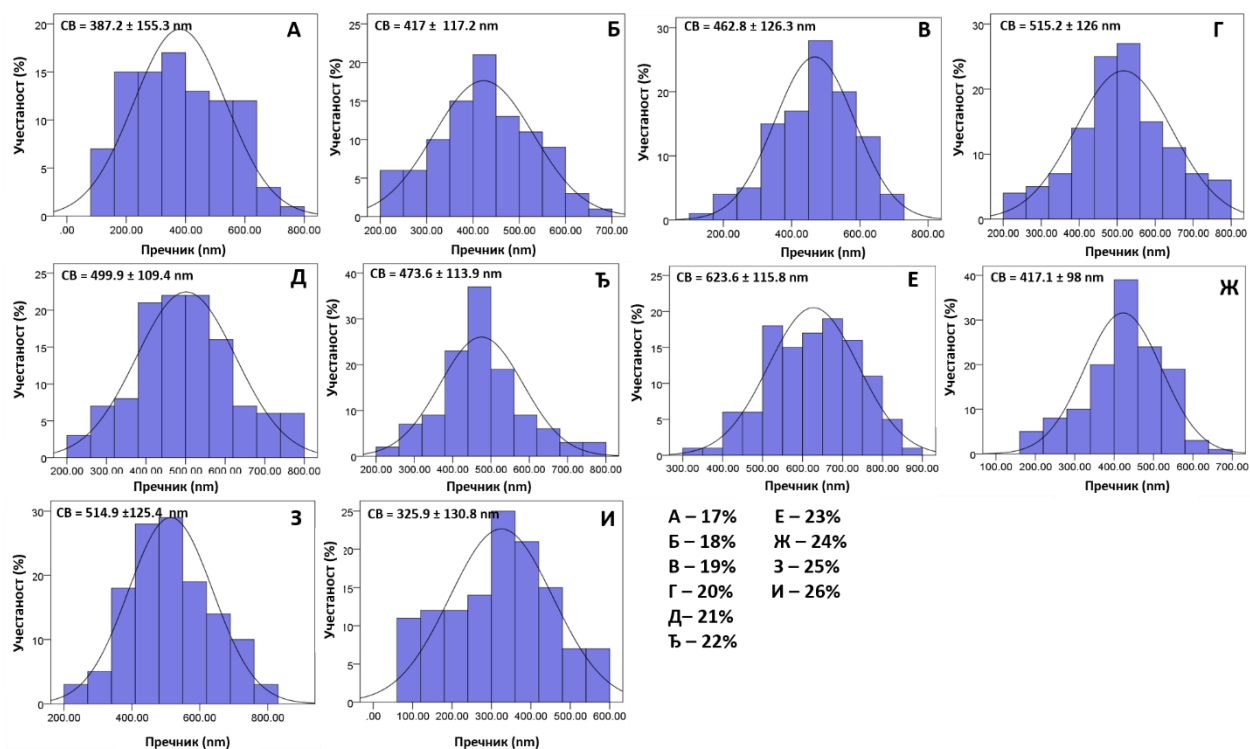
Слика 4П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 2: PCL у $\text{CHCl}_3:\text{DMF}=1:1$. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ђ) 22% Е) 23% Ж) 24% З) 25% И) 26% Ј) 27%



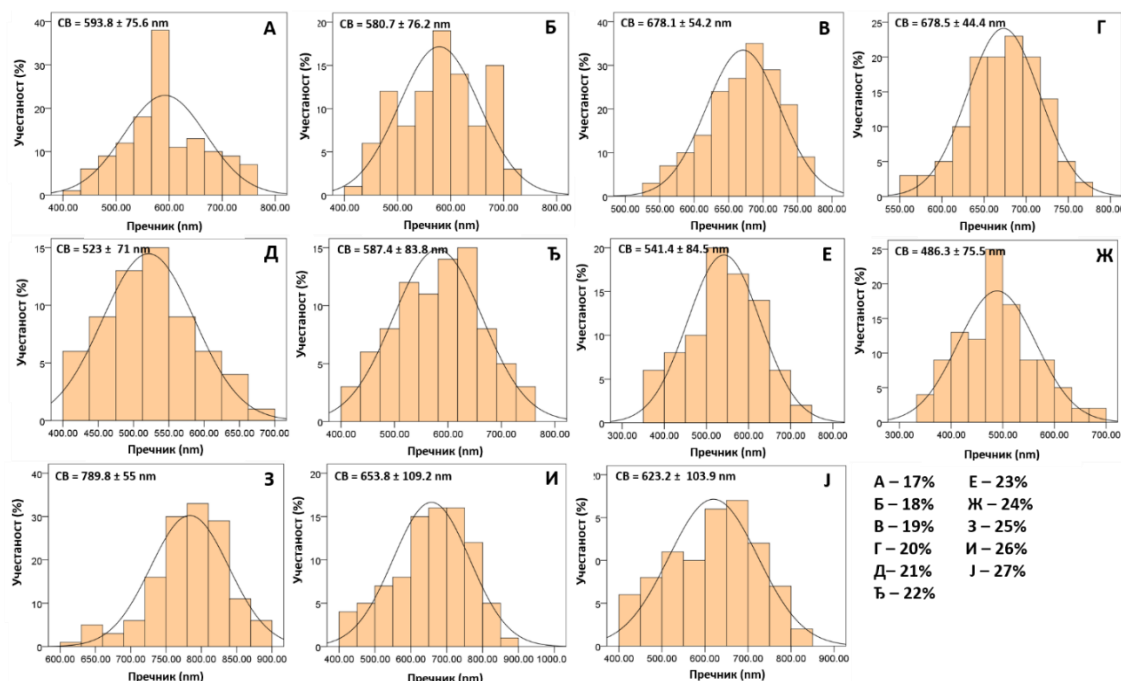
Слика 5П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 3: PCL у CHCl_3 :DMF=1:3. А) 17% Б) 18% В) 19%



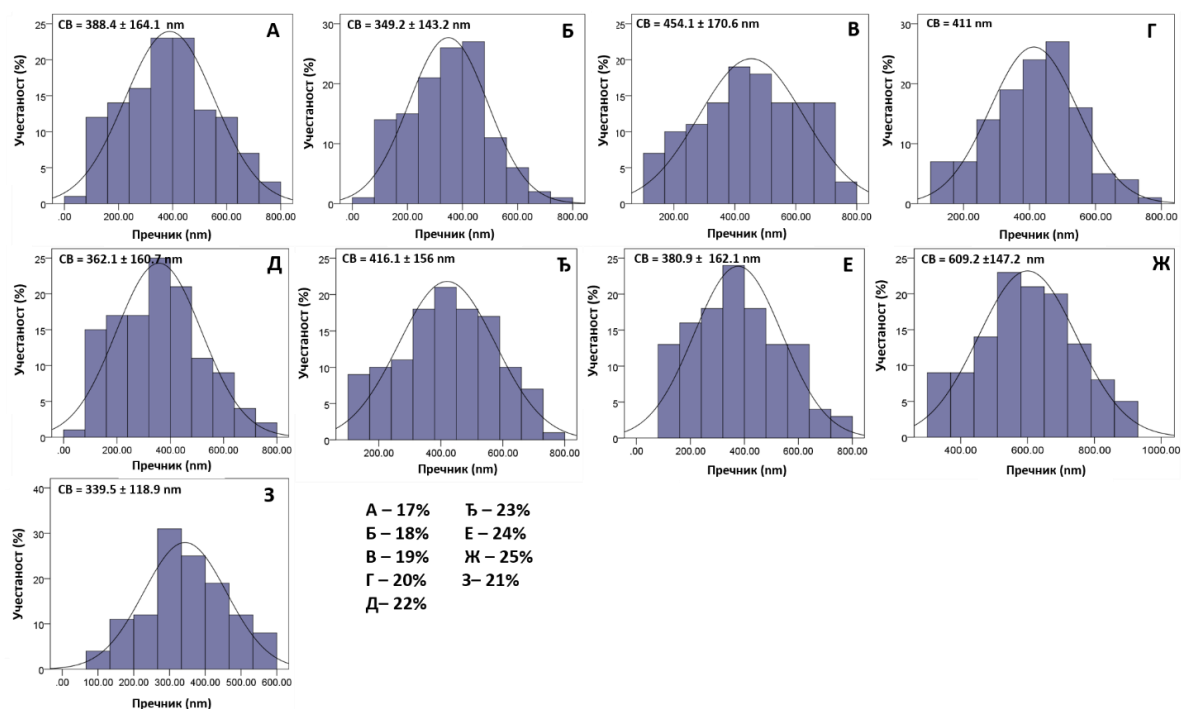
Слика 6П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 4: PCL у CHCl_3 :DMF=3:1. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21%



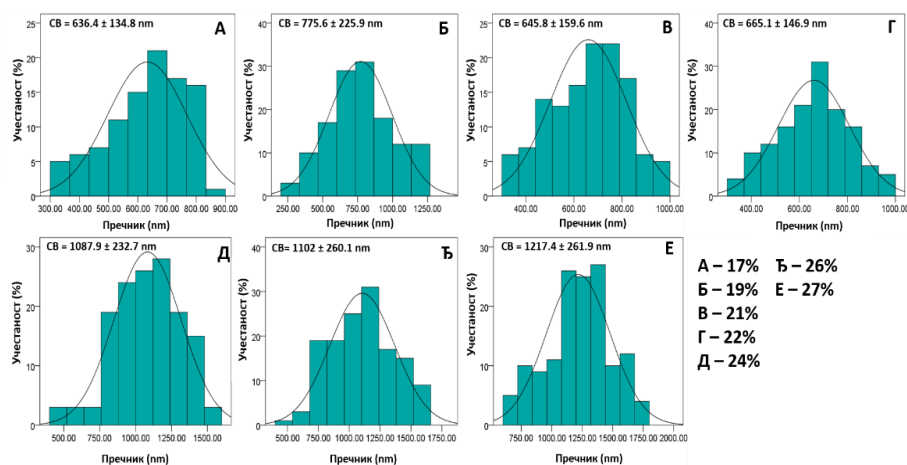
Слика 7П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 5: PCL:PEG=1:1 у CHCl_3 . А) 17% Б) 18% В) 20% Г) 21% Д) 22% Ђ) 24% Е) 25% Ж) 26% З) 27% И) 28%



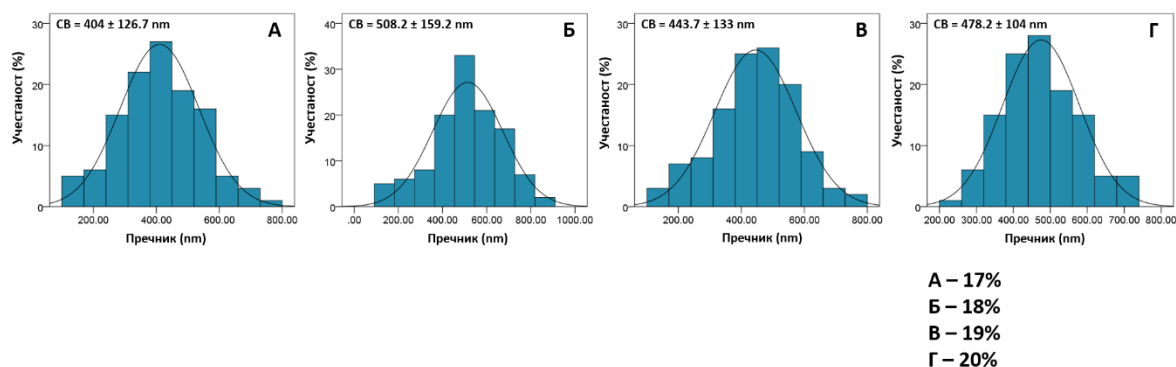
Слика 8П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 6: PCL:PEG=1:1 у CHCl_3 :DMF=1:1. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ђ) 22% Е) 23% Ж) 24% З) 25% И) 26% Ј) 27%



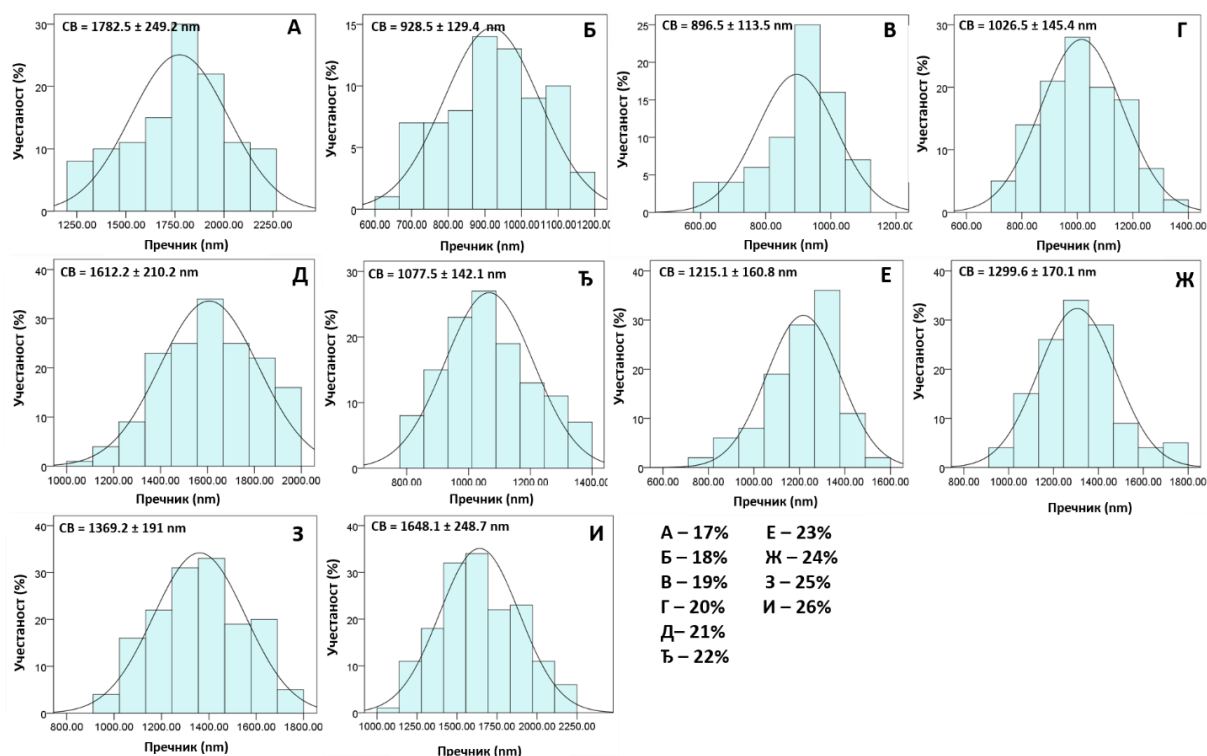
Слика 9П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 7: PCL:PEG=1:1 у CHCl₃:DMF=3:1. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ђ) 22% Е) 23% Ж) 24% З) 25%



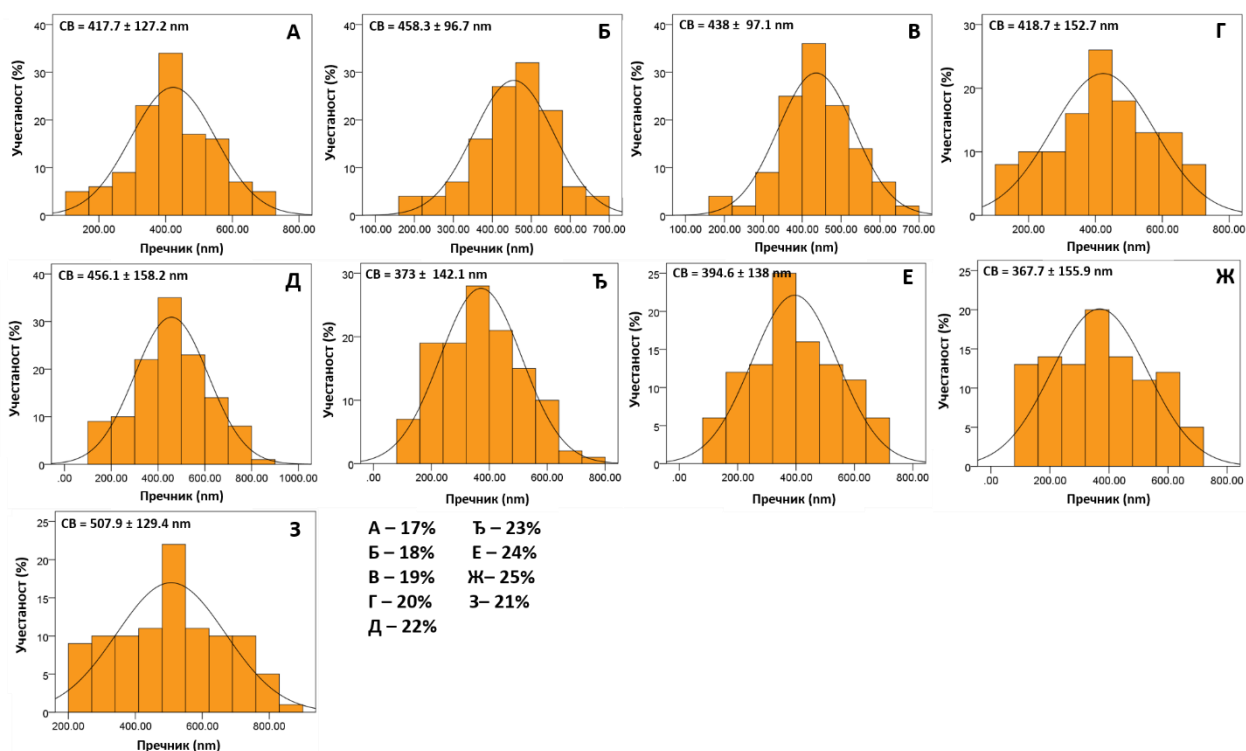
Слика 10П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 8: PCL:PEG=3:1 у CHCl₃:DMF=1:1. А) 17% Б) 19% В) 20% Г) 21% Д) 22% Ђ) 24% Е) 26%



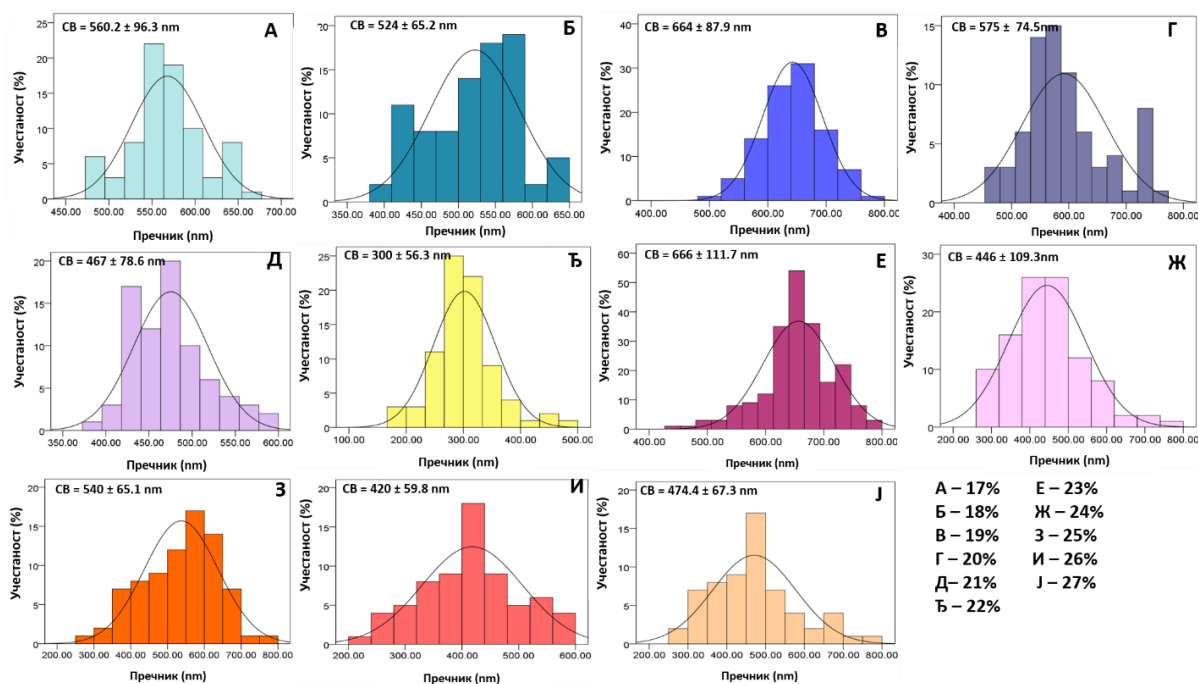
Слика 11П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 9: PCL:PEG=3:1 у CHCl_3 :DMF=1:3. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 22%



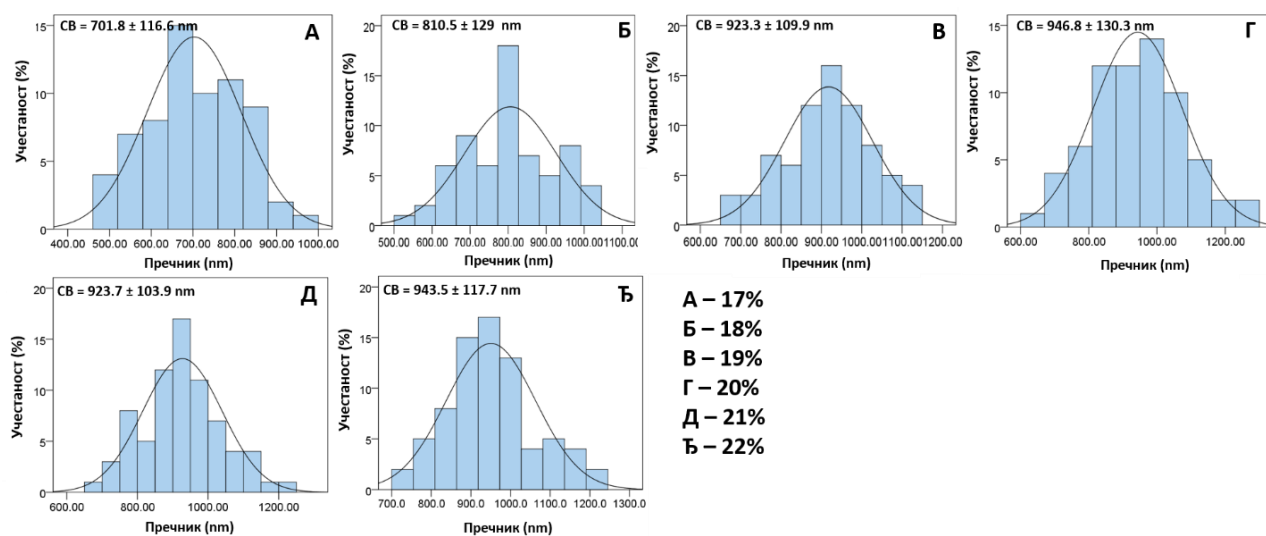
Слика 12П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 10: PCL:PEG=3:1 у CHCl_3 :DMF=3:1. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ё) 22% Е) 23% Ж) 24% З) 25% И) 26%



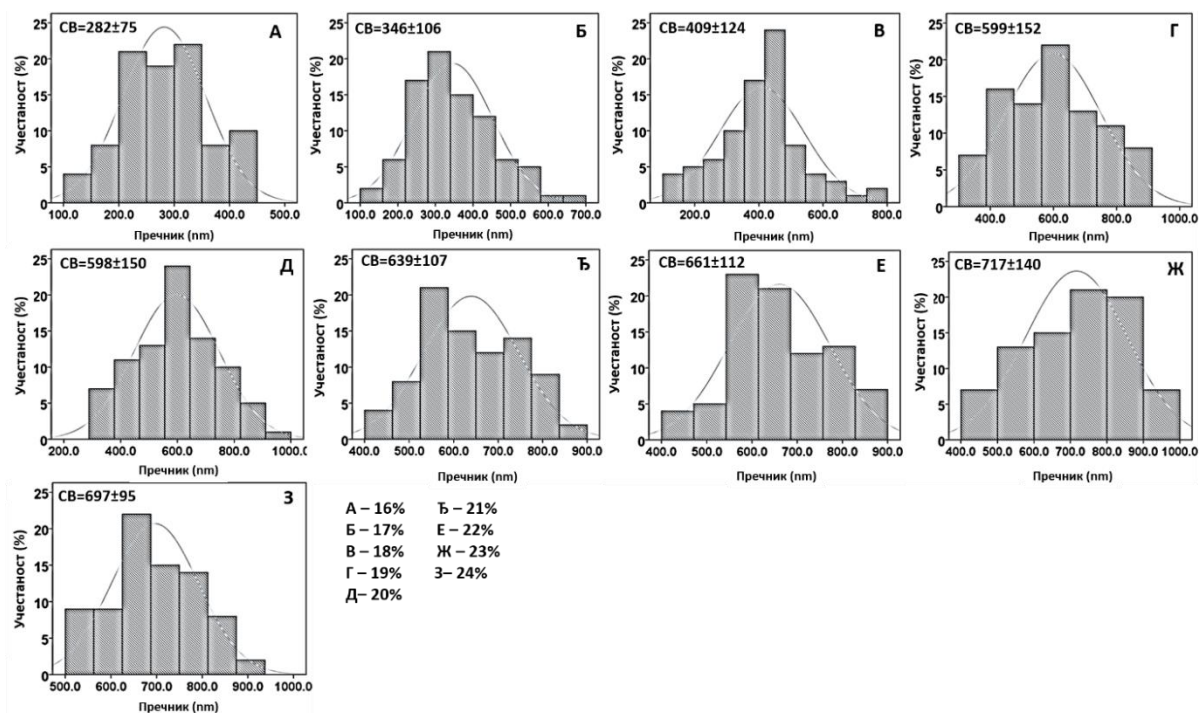
Слика 13П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 15: PCL:PEG=1:3 in CHCl₃:DMF=3:1. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ђ) 22% Е) 23% Ж) 24% З) 25%



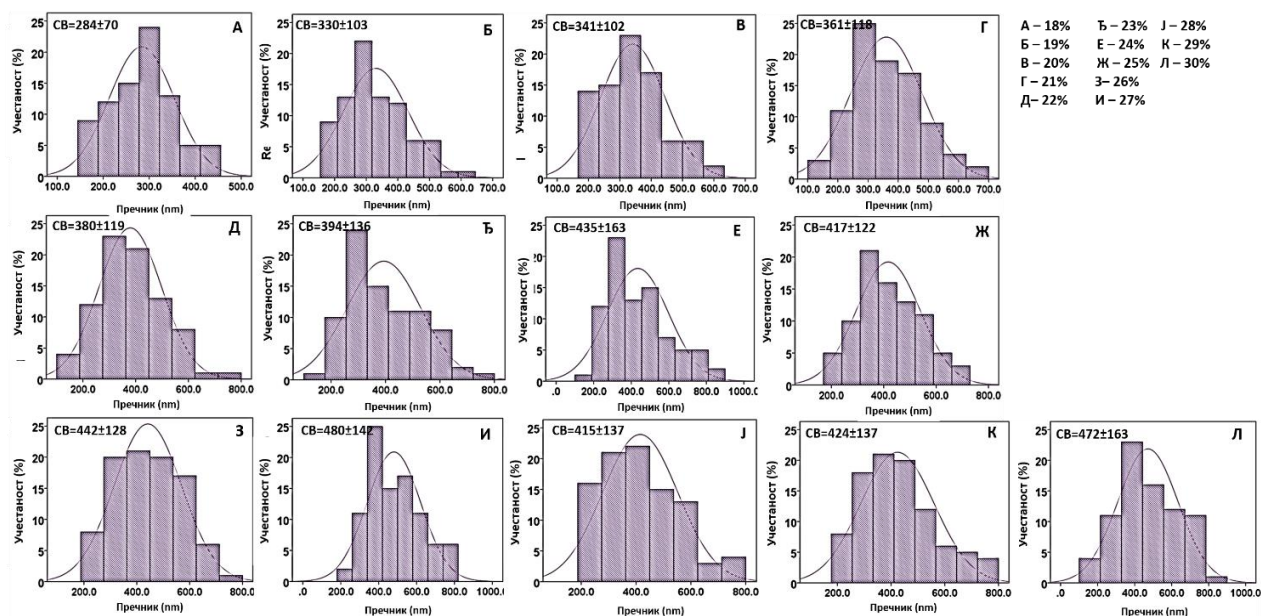
Слика 14П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 16: PCL:PEG=7:3 у CHCl₃:DMF=7:3. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ё) 22% Е) 23% Ж) 24% З) 25% И) 26% J) 27%



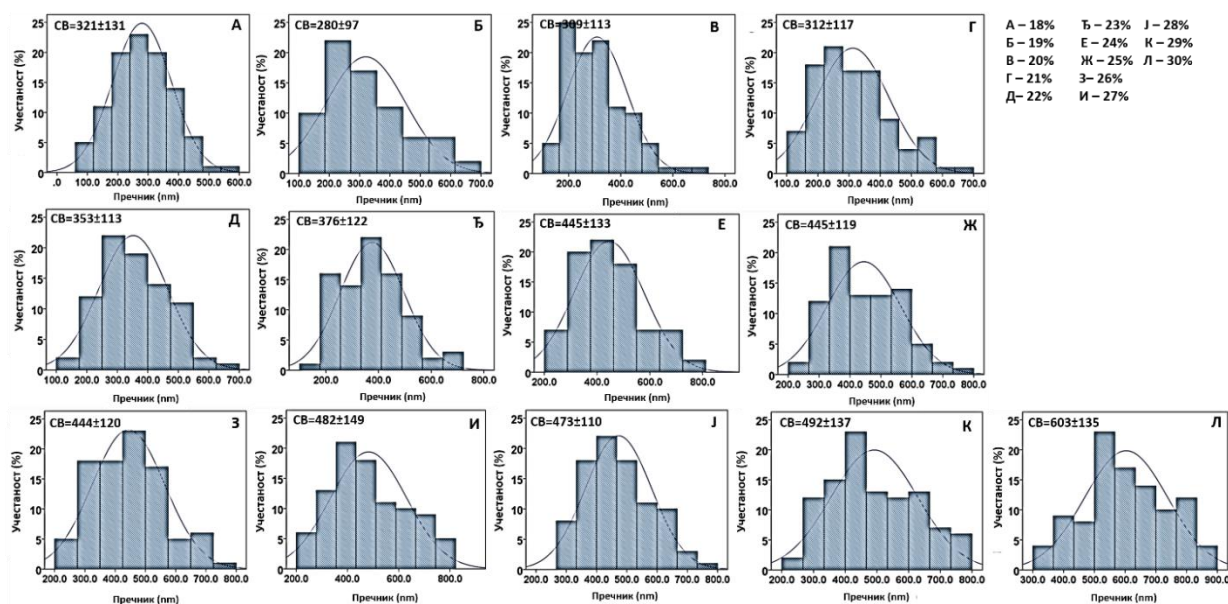
Слика 15П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 17: PCL:PEG=3:1 у CHCl₃. А) 17% Б) 18% В) 19% Г) 20% Д) 21% Ё) 22%



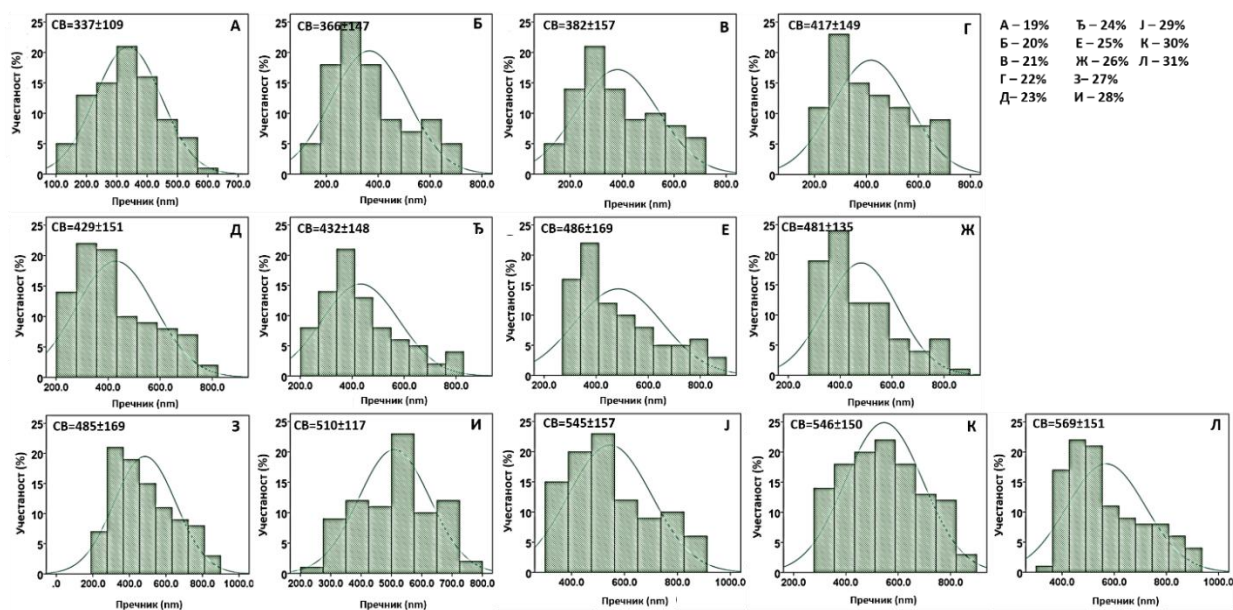
Слика 16П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 1: Желатин у 99.8% АсА: 9% DMSO (93:7) А) 16% Б) 17% В) 18% Г) 19% Д) 20% Б̂) 21% Е) 22% Ж) 23% З) 24%



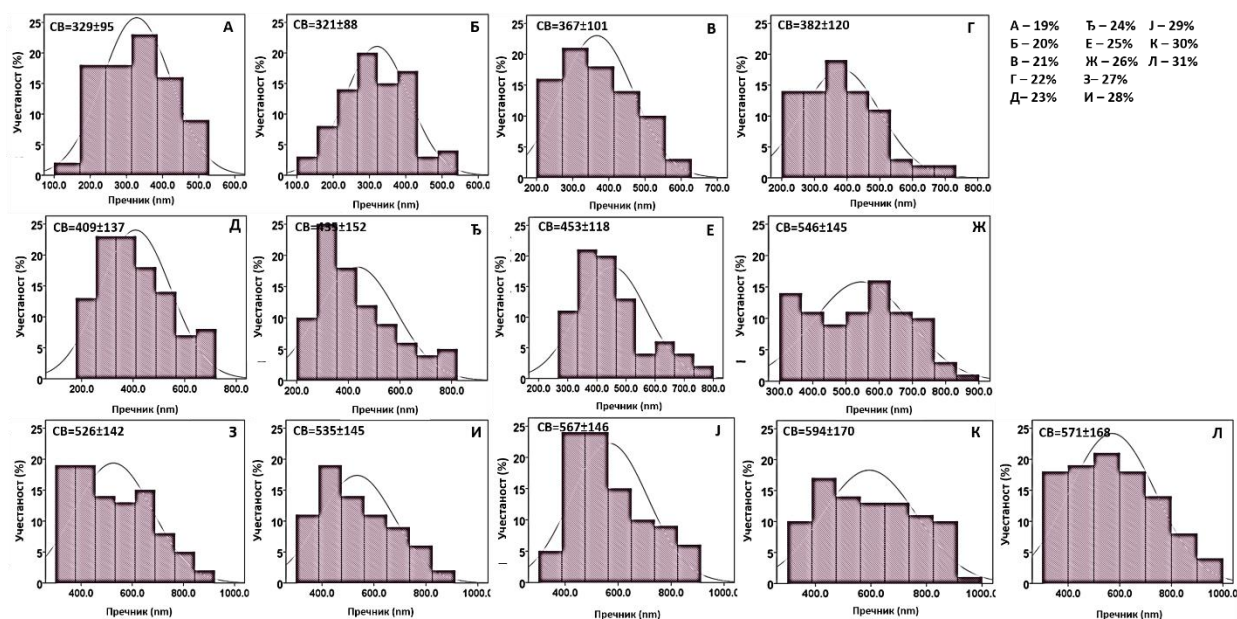
Слика 17П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 2: Желатин у 70% АсА: 9% DMSO (93:7) А) 18% Б) 19% В) 20% Г) 21% Д) 22% Б̂) 23% Е) 24% Ж) 25% З) 26% И) 27% Ј) 28% К) 29% Л) 30%



Слика 18П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 3: Желатин у 70% АсА: 9% DMSO (97:3) А) 18% Б) 19% В) 20% Г) 21% Д) 22% Ђ) 23% Е) 24% Ж) 25% З) 26% И) 27% Ј) 28% К) 29% Л) 30%



Слика 19П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 4: Желатин у 70% АсА: 9% DMSO (91:9) А) 19% Б) 20% В) 21% Г) 22% Д) 23% Ђ) 24% Е) 25% Ж) 26% З) 27% И) 28% Ј) 29% К) 30% Л) 31%



Слика 20П. Анализа дистрибуције пречника влакана електроспинованих скефолда за серију 5: **Желатин у 70% АсА: 9% DMSO (95:5)** А) 19% Б) 20% В) 21% Г) 22% Д) 23% Ђ) 24% Е) 25% Ж) 26% З) 27% И) 28% Ј) 29% К) 30% Л) 31%

БИОГРАФИЈА

Катарина Д. Виријевић је рођена 27.03.1992. године у Јерменији, Јеревану. Основну школу Трећу гимназију је завршила у Москви, Руска Федерација. Школовање је наставила у Другој гимназији у Крагујевцу, општи смер. Природно-математички факултет у Крагујевцу уписала је 2011. године, на Институту за хемију, где завршава основне академске студије, смер заштита животне средине, са просечном оценом 8,35. Мастер академске студије уписала је на истом факултету 2017. године, заштита животне средине. Поменути ниво студија завршила је 2018. године са просечном оценом 10,00. Такође, 2019. године уписује друге мастер академске студије на Факултету инжењерских наука, на смеру Биоинжењеринг, Универзитета у Крагујевцу. Завршава наведене студије 2021. године са просечном оценом 9,80.

Докторске академске студије Катарина Виријевић уписала је 2022. године на Факултету инжењерских наука, Универзитета у Крагујевцу, на смеру Биоинжењеринг, а као ментора изабрала је др Марка Живановића и коментора проф. др Ненада Филиповића. Тренутно је на трећој години докторских студија на којима је положила све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 10,00. Од априла 2020. године запослена је на Институту за информационе технологије у Крагујевцу као истраживач-приправник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја (број: 451-03-68/2022-14/200378 за 2022. годину).

Катарина Виријевић је учествовала на више стручних усавршавања: 2019. године је учествовала у Workshop Bioinformatics обуци у организацији Seven Bridges Genomics. Током 2020. године је похађала Зимску школу Протеомике, под називом „Proteomics: From sample preparation to practical aspects“, у Београду, у организацији Хемијског факултета, Универзитета у Београду и FoodEnTwin пројекта (у оквиру Horizon 2020). У септембру 2020. године као млади истраживач је добила стипендију KMM-VIN, Research Fellowship на Технолошком Универзитету у Бечу, Аустрији, у трајању од месец дана. Похађала је CPD курс (School of practical application of high performance liquid chromatography). Матерњи језици су јој руски и српски, а говори и енглески језик (напредни ниво).

Катарина Виријевић бави се научно-истраживачким радом у области ткивног инжењеринга, са посебним акцентом на синтези и развоју наноматеријала. Њена истраживања обухватају синтезу и детаљну карактеризацију полимерних наноматеријала, како вештачких тако и природних, као и испитивање њихових хемијских, физичких и биолошких својстава. Главни циљ њених истраживања је развој иновативних биоматеријала за примену у области зарастања рана, са фокусом на побољшање процеса зарастања и регенерације ткива.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

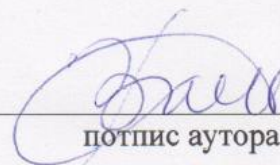
“Синтеза полимерних наноматеријала методом електроспининга и примена у области ткивног инжењеринга”

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 06.06.2025 године



потпис аутора

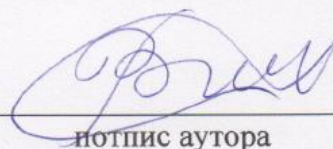
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**“Синтеза полимерних наноматеријала методом електроспининга и примена у
области ткивног инжењеринга”**

истоветне.

У Крагујевцу, 06.06.2025 године,

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and strokes, positioned above a horizontal line.

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Катарина Виријевић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

“Синтеза полимерних наноматеријала методом електроспининга и примена у ткивном инжењерингу”

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

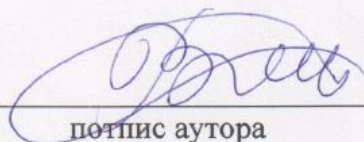
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²**

У Крагујевцу, 06.06.2025 године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>