

»Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje

**KONTROLIRANO SPROŠČANJE PROTEINOV IZ POROZNIH
BIORAZGRADLJIVIH KOMPOZITNIH MATERIALOV**

Raziskovalno področje: KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtor: EVA PATIK

Mentor: GREGOR KRAVANJA IN MAJA LEITGEB, DARJA KRAVANJA

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 165

Mesto: 2

Priznanje: zlato

Maribor, 2019

»Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje

**KONTROLIRANO SPROŠČANJE PROTEINOV IZ POROZNIH
BIORAZGRADLJIVIH KOMPOZITNIH MATERIALOV**

Raziskovalno področje: KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtor: EVA PATIK

Mentor: GREGOR KRAVANJA IN MAJA LEITGEB, DARJA KRAVANJA

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 165

Mesto: 2

Priznanje: zlato

Maribor, 2019

Vsebina

POVZETEK	5
ZAHVALA	6
1. UVOD	7
1.1. Namen	8
1.2. Hipoteze	8
2. ZNANSTVENO OZADJE	9
2.1. Biomateriali in umetni materiali	9
2.1.1. Polikaprolakton (PCL).....	10
2.1.2. Hitozan (CS).....	11
2.1.3. Serum iz govejega albumina ali goveji serumski albumin (BSA).....	12
2.1.4. Encim transglutaminaza (TGM).....	12
2.2. Superkritični fluidi	13
3. METODOLOGIJA DELA	15
3.1. Material	15
3.2. Priprava poroznega ogrodja s scCO₂	16
3.3. Diferencialna dinamična kalorimetrija (DSC)	18
3.4. Okoljski skenirajoč elektronski mikroskop (ESEM)	18
3.5. Poroznost materiala	19
3.6. Bradfordova metoda za določevanje totalnih beljakovin	19
3.7. Encimski test za encim transglutaminazo	20
4. REZULTATI IN DISKUSIJA	24
4.1. DSC analiza	24
4.2. ESEM analiza in poroznost	24
4.3. Sproščanje proteina BSA	26
4.4. Sproščanje in aktivnost encima transglutaminaza	28
5. ZAKLJUČEK	30
6. DRUŽBENA ODGOVORNOST	31
7. VIRI IN LITERATURA	32
8. PRILOGE	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Skeletna formula člena PCL.....	11
Slika 2: Skeletna formula člena hitozana.....	11
Slika 3: BSA	12
Slika 4: Struktura mikrobne transglutaminaze.	12
Slika 5: Fazni diagram	13
Slika 6: Poenostavljen prikaz priprave poroznega ogrodja s scCO ₂	16
Slika 7: Digitalni ultrazvočni čistilnik.....	16
Slika 8: Priprava za obdelavo s scCO ₂	17
Slika 9: Slika vzorcev za enkapsuliran BSA	20
Slika 10: Reakcija transglutaminaze.	21
Slika 11: Postopek dodajanja reagentov	23
Slika 12: Elektronska mikroskopska slika za a) PCL 10 000 + 5 % CS in b) PCL 60 000 + 5 % CS.	25
Slika 13: Količina sproščenega BSA na 50 mg poroznega materiala.....	26
Slika 14: Odstotki sproščenega proteina.....	26
Slika 15: Sprostitev TGM na 50 mg vzorca.	28
Slika 16: Aktivnost TGM na 50 mg poroznega vzorca.	28
Slika 17: Porozni biomaterial za umetni hrustanec.	30

KAZALO TABEL

Tabela 1: Zaporedje in količina dodajanja reagentov za določanje aktivnosti encima transglutaminazo.	22
Tabela 2: Temperature tališč in specifične talilne entalpije:	24
Tabela 3: Priprava biološko razgradljivih kompozitnih materialov (37 °C in tlaku 15 MPa):	25
Tabela 4: Koncentracije proteina, sproščenega iz treh enako velikih delov.	27
Tabela 5: Rezultati sproščene transglutaminaze in njene aktivnosti	29

POVZETEK

Biorazgradljivo porozno kompozitno ogrodje, sestavljeno iz sintetičnega polikaprolaktona in naravnega hitosana, v katero smo ujeli protein bovine serum albumin (BSA) in encim transglutaminaza, smo pripravili z metodo penjenja s superkričnim CO₂. Ko smo ustvarili emulzijo v fosfatnem pufru raztopljenega proteina ter topila z raztopljenim polimerom, smo pri temperaturi 37 °C in tlaku 12 MPa s superkričnim CO₂ povzročili, da je kompozitni material lahko ujel encim ter protein. Z DSC metodo smo ugotavljali, ali je nastali material zares kompozitni, z ESEM metodo pa smo opazovali površino materiala ter njegovo poroznost. Za spremljanje sproščanja proteina BSA smo uporabili Bradfordovo metodo. Ker nas je zanimalo terapevtsko delovanje transglutaminaze, smo z encimskim testom nadzirali sproščanje tega encima in njegovo aktivnost. Nova spoznanja, pridobljena s tem poskusom, bi lahko bila uporabljena pri tkivnem inženiringu za oblikovanje novih in izboljšanih tkiv in/ali organov.

ZAHVALA

Zahvalila bi se svojim mentorjema, ki sta me ob izvajanju poskusov in pisanju raziskovalne naloge usmerjala, mi dajala razne napotke in napisano dopolnjevala z nasveti ter ostalimi koristnimi informacijami.

Rada bi se zahvalila tudi študentki, ki mi je kljub svojim vsakodnevnim obveznostim pomagala pri izvajanju laboratorijskih poskusov in njihovi analizi.

Prav tako bi se rada zahvalila vsem ostalim pristojnim, ki so s svojim znanjem in poznavanjem tega kemijskega področja prisostvovali h končnemu izidu raziskovalne naloge ter preverili pravilnost in strokovnost zapsanega.

1. UVOD

Vsako leto je več pacientov, ki trpijo zaradi odpovedi ali izgube organov/tkiv, kar zahteva milijone kirurških posegov. Eden izmed načinov reševanja tega problema zajema presaditev organa ali tkiva, torej avtografte in alografte. Avtografiti/avtologni presadki predstavljajo razpoložljive transplantate, ki jih dobimo na drugem delu bolnikovega telesa, medtem ko alografiti zajemajo dele humanega organa iz banke oz. drugega darovalca. Glavni problem tega načina je v nesprejemanju novega tkiva ali organa, obolenost na mestu darovalca, imunološki odziv ter tveganje za prenos bolezni. (Im, 2003, str. 76)

Znanstveniki in medicinska stroka se pri tkivnem inženiringu ukvarjajo z razvojem številnih novih tehnik terapevtskih pristopov za ustvarjanje novih tkiv in zdravljenje bolnikov. V zadnjem času je bil velik poudarek na sintetičnih materialih, ki bi lahko nadomestili dele telesa, izgubljene zaradi bolezni ali poškodb (Sheridan in sod., 1999, str. 92). Sprva so najpogosteje za to uporabljali kovine ali keramiko, vendar imajo ti materiali številne pomanjkljivosti, saj se težje odstranijo iz telesa (Su, 2003, str. 77). V ta namen so izčrpno raziskali biorazgradljive polimere na področju rekonstruktivne kirurgije, saj se ti biomateriali enostavno odstranijo iz telesa, ko so odslužili svoj namen. Novi sintetični materiali morajo ustrezati fizikalnim in kemičnim lastnostim tkiva gostitelja, da bi zagotovili mikrookolje za interakcije med celicami in matriki, ki posnemajo biološko okolje. (Dariš, 2016, str. 43) Številni naravno dobljeni polimeri, kot so kolagen, želatina, albumin, hitosan in škrob, ter kemosintetični polimeri, npr. poli (glikolna kislina), poli (mlečna kislina), poli (hidroksil butirata), poli (ϵ -kapolakton) in njihovi kopolimeri, so se že uporabljali pri številnih iznajdbah. (Kravanja in sod., 2018, str. 2).

V tkivnem inženiringu se uporabljajo biološko razgradljiva porozna polimerna ogrodja (ang. scaffolds), ki imajo pomembno vlogo pri rekonstrukciji ali regeneraciji funkcij organov v kombinaciji z bioaktivni sredstvi (npr. ravnimi faktorji, encimi, zdravilnimi učinkovinami). V zadnjih dveh desetletjih je bil dosežen velik napredek z uporabo superkritičnega CO₂ (scCO₂) kot medij za penjenje polimerov pri nastanku poroznih materialov. ScCO₂ je nestrupen, nevnetljiv, kemično inerten in okolju prijazen fluid, zaradi ugodne cene pa predstavlja odlično alternativo toksičnim organskim topilom, ki so lahko potencialno škodljiva za celice. ScCO₂, raztopljen v polimeru, zmanjša viskoznost, deluje kot mehčalec in omogoča obdelavo pri nižjih temperaturah, kar predstavlja še dodatno prednost pri novem materialu. (Kravanja in sod., x, str. 2)

Iskanje idealnih poroznih biomaterialov je še vedno predmet številnih raziskav, v katerih se upošteva kinetika rasti celic, razgradnja ogrodja, mehanske napetosti na mestu implantacije in interakcija celica-material. (Sarasam, Madihally, 2005, str. 5000)

1.1. Namen

Namen te raziskovalne naloge je uporaba superkritičnih fluidov, tako imenovanih zelenih topil, za nastanek novih poroznih kompozitnih materialov. Dobljen kompozitni material je sestavljen iz sintetičnega polimera polikaprolaktona (PCL) ter acetiliranega naravnega polimera, najdenega v rakovih oklepkih, hitozana (CS). Kompozitni material vsebuje boljše lastnosti obeh sestavnih polimerov, saj CS lahko dobro integrira z živimi organizmi, PCL pa se pod superkritičnimi pogoji (pri temperaturi 304,5 K in tlaku 7,39 MPa) plastificira, kar omogoča ujetje biološko aktivnih komponent in lažjo mešljivost polimerov, ki tvorijo kompozitni material. V kompozitni material smo vgradili encim transglutaminaza. Nadalje smo z Bradfordovo metodo merili kontrolirano sproščanje proteinov iz pripravljenih poroznih biomaterialov ter z aktivnostnim testom merili aktivnost sproščene transglutaminaze.

Z uporabo $scCO_2$ smo se izognili uporabi toksičnih topil in visokih temperatur, ki lahko uničijo ujet protein oz. encim ter ga denaturirajo in dezaktivirajo.

1.2. Hipoteze

Pred izvajanjem poskusov smo si zadali šest hipotez, ki smo jih z raziskavami želeli potrditi ali ovreči:

HIPOTEZA 1: z uporabo $scCO_2$ lahko nastanejo novi porozni kompozitni materiali.

HIPOTEZA 2: v nastalem kompozitnem materialu bo razporeditev por enakomerna.

HIPOTEZA 3: uporaba superkritičnih fluidov onemogoči uničenje ujetih proteinov.

HIPOTEZA 4: enkapsulirani testni protein bovine serum albumin (BSA) se sprošča kontrolirano skozi porozni material.

HIPOTEZA 5: enkapsulirani encim transglutaminaza se sprošča kontrolirano skozi porozni material.

HIPOTEZA 6: sproščena transglutaminaza bo imela večdnevno terapevtsko delovanje.

Kot omejitev lahko izpostavimo, da občasno pride do puščanja visokotlačne celice, kar pomeni, da nam tlak v sistemu konstantno pada in posledično ne moremo doseči ravnotežja.

2. ZNANSTVENO OZADJE

2.1. Biomateriali in umetni materiali

Zdravljenje mnogih bolezenskih stanj zahteva kirurški poseg, ki pomaga, dopolnjuje, vzdržuje ali nadomešča bolne organe ali tkiva - takšni postopki pa vključujejo uporabo snovi, ki so telesu tuje. To so lahko biomateriali, ki zajemajo naravne polimere, ali umetni materiali, ki vključujejo kovine, keramiko ali sintetične polimere, ustvarjene v laboratoriju. Umetni in biomateriali se uporabljajo na kardiovaskularnih, ortopedskih in zobozdravstvenih področjih ter v širokem spektru za vsaditev, zasnovanih za povečanje ali nadomestitev bolnega človeškega organa. Ti postopki prinašajo odlične rezultate in klinične uspehe, npr. na področju zdravljenja srca in ožilja so rešili na tisoče življenj srčni ventili, srčni spodbujevalniki in vaskularni presadki, prav tako pa so ortopedske zamenjave kolkov pokazale dolgoročne uspehe pri zdravljenju bolnikov, ki trpijo zaradi boleznih sklepov. Posledično se povpraševanje po številnih biomaterialih vsako leto vidno poveča. (Encyclopædia Britannica, Inc., 2019)

Raziskave o razvoju novih biomaterialov so interdisciplinarna prizadevanja, ki pogosto vključujejo sodelovanje med znanstveniki, biomedicinskimi inženirji, inženirji za materiale, patologi in kliniki za reševanje kliničnih problemov. Novonastale materije so izpostavljene človeškemu tkivu in človeški tekočini, tako da je napovedovanje rezultatov možnih interakcij med gostiteljem in materialom pomemben in edinstven vidik pri uporabi sintetičnih materialov v medicini. Paziti moramo, kateri material bomo uporabljali, saj lahko nekateri privedejo do številnih nevarnosti in ostalih kliničnih težav (npr. izbira silikonske gume kot cilinder v oblikovanju zgodnji srčnih zaklopk). (Encyclopædia Britannica, Inc., 2019)

Sposobnost pravilnega odziva vsajenega materiala v odnosu do gostitelja imenujemo biokompatibilnost. Loči se glede na površinsko in strukturno kompatibilnost vsadka. Površinska kompatibilnost pomeni kemijsko, biološko in fizikalno usklajenost vsadka z gostiteljevim telesom, medtem kot strukturna kompatibilnost predstavlja optimalno prilagoditev mehanskemu delovanju gostiteljevega tkiva. Kaže na mehanske lastnosti vsadka: elastični modul, trdnost, obliko vsadka in minimalno medfazno napetost na stiku gostiteljevega tkiva z vsadkom. Za optimalno interakcijo sta tako potrebni obe kompatibilnosti. Ker je biokompatibilnost ena izmed večjih težav, predstavlja optimizacija tega problema ključ za nadaljnji napredek. (Paradiž, 2007, str. 4)

Celice nimajo te zmožnosti, da bi proizvajale kovinske strukture, zato se v živih bitjih kot gradbeni material uporabljajo nanometalični minerali in številni polimeri. V našem telesu se nahajajo številni naravni polimeri, kot so npr. kolagen, elastin, keratin in apatit. Kolagen predstavlja vezivno snov v našem telesu in je eden izmed pomembnejših proteinov. S staranjem pa se veča število vozlišč, kar poveča trdnost in zmanjša elastičnost (npr. koža). Elastin je protein, pomemben zaradi svoje elastičnosti pri velikih obremenitvah. Nahaja se v različnih mešanica s kolagenom v tkivih (npr. v koži, stenah žil). Tudi elastin s staranjem pridobiva na trdoti in izgublja elastičnost. Keratin je protein, najden v lasih in dlakah. Je trden in tog, saj ima močno prepletene polimerne verige, pod visokim tlakom spremeni svojo strukturo (α - in β -struktura). Apatit je mineral, ki ga pretežno najdemo v kosteh in določenih hrustancih. (Paradiž, 2007, str. 7)

Materiale, ki se uporabljajo v medicinske namene, lahko po snovnih lastnostih razdelimo na kovine, biokeramiko in polimere. Kovine so zelo trdne, zato so primerne za nosilno strukturo medicinskih vsadkov, pri katerih je potrebno prenašati relativno večje bremenilne sile (npr. kostne ploščice in razni sklepni nadomestki). Problem kovinskih materialov je nizka biokompatibilnost, korozija, odpuščanje kovinski ionov, kar lahko v tkivu povzroči alergijske reakcije, v nasprotju z naravnimi tkivi pa imajo visoko togost. Keramični materiali so zelo dovzetni za tesno vezavo s tkivi. So izredno biokompatibilni in ne puščajo ionov kakor kovine. So krhkejši in lažje lomljivi od naravnih biomaterialov. Problem biokeramike je tudi težja izdelava. So slabo kemično reaktivne s snovmi v telesu. Najpogosteje uporabljene biokeramike vsebujejo aluminijev oksid, hidroksiapatit in cirkonij. Izmed vseh umetnih materialov imajo sintetični polimeri največ prednosti - fizikalne, kemijske in mehanske lastnosti so podobne tistim, ki jih imajo živa tkiva, so enostavni za predelavo in proizvodnjo v različnih oblikah, imajo pa tudi nizko gostoto. Najpogosteje so uporabljeni v kontaktnih lečah, akril-cementnih kosteh ali protezah. Med najpogosteje uporabljenimi polimernimi materiali so: polimetilmetakrilat (PMMA), polidimetilsiloksan (PDMS), ultra visoka molska masa iz polietilena (UHMWPE) ... (Paradiž, 2007, str.11)

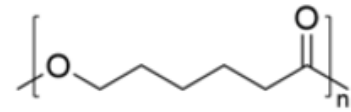
Naš namen je ustvariti nov kompozitni material in vanj ujeti proteine. Tako smo ustvarili kompozitni material iz naravnega polimera hitozana in sintetičnega polikarprolaktona, vanj vgradili protein BSA in translutaminazo ter nadzirali njuno kontrolirano sproščanje.

2.1.1. Polikaprolakton (PCL)

PCL je biorazgradljiv in biokompatibilen poliester, ki ga pripravimo s polimerizacijo ϵ -kaprolaktona, tako da s pomočjo katalizatorja odpremo prvotni obroč. Pogosto se uporablja pri dolgotrajnih implantatih in aplikacijah za kontrolirano sproščanje zdravil. Vgradnja keramike na osnovi kalcijevega fosfata in bioaktivnih stekel v PCL je zaradi izboljšanja številnih mehanskih lastnosti povzročila velik napredek v inženiringu kostnega tkiva. Prav tako se uporablja na hitro rastočem področju človeške estetike, saj lahko s stimulacijo proizvodnje kolagena popravijo znake staranja obraza. (Sarasam, Madihally, 2005, str. 5001)

Po drugi strani pa je PCL vsestranski sintetični polimer z nizkim tališčem, ki omogoča enostavno obdelavo. Vendar pa ima PCL:

- omejeno bioregulacijsko dejavnost,
- hidrofobnost (prepreči prodiranje celic v porozno strukturo),
- dovzetnost za bakterijsko posredovano razgradnjo,
- odsotnost mest za prepoznavanje celic na površini ogrodij (lahko vodi do slabe afinitete in adhezije celic),
- počasna razgradnja (zaradi visoke kristaliničnosti). (Sarasam, Madihally, 2005, str. 5001).



poli(ϵ -kapolakton)

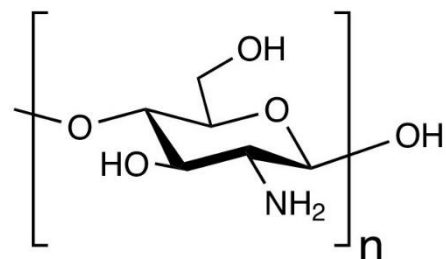
Slika 1: Skeletna formula člena PCL (<https://goo.gl/tjGE9G>).

2.1.2. Hitozan (CS)

CS izhaja iz N-deacetilacijske ¹ oblike hitina in je eden izmed glavnih elementov, ki izvira iz lupin členonožcev (npr. raki, kozice, jastogi in žuželke). (Šega, 2018, str. 2)

Hitozan in biomateriali, pridobljeni iz njega, so ustvarili velik interes zaradi svojih različnih prednosti, kot so:

- lahka razpoložljivost (deacetiliran iz hitina, ki je drugi najbolj razširjeni naravni polimer),
- pozitivni naboj (omogoča interakcijo z negativno nabitimi glikozaminolognimi kanali, prisotnimi v zunajcelični matrici),
- biokompatibilnost,
- protimikrobna aktivnost,
- obnovljivost,
- netoksičnost,
- biološka razgradljivost,
- nizka cena. (Sarasam, Madihally, 2005, str. 5001)



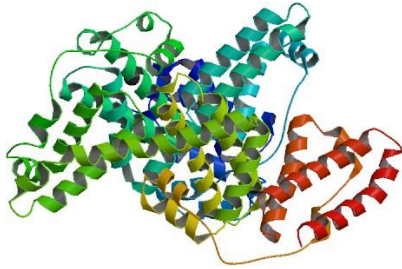
Slika 2: Skeletna formula člena hitozana. (<https://goo.gl/GCgvM6>)

Hitozan ni topen v vodi ali organskih topilih; ker je topen v šibkih kislinah, ga je mogoče enostavno predelati v porozna ogrodja. Vendar pa manjša prilagodljivost pri urejanju mehanskih lastnosti in biorazgradljivosti omejuje njegovo uporabo - v mokrem stanju so filmi hitozana namreč zelo krhki. (Sarasam, Madihally, 2005, str. 5001)

¹ Reakcija hidrolitične odcepitev acetilne skupine od substrata.

2.1.3. Serum iz govejega albumina ali goveji serumski albumin (BSA)

BSA (znan tudi kot "Fraction V") je beljakovinski serumski albumin, izoliran iz krav. BSA se proizvaja v različnih oblikah za uporabo v imunologiji, biokemiji in biotehnologiji. (Yan in sod., 2004, str. 914)



Služi kot rezerva za beljakovine, poleg tega deluje kot nosilec in vezni protein v sistemu krvnega obtoka za maščobne kisline, rastne faktorje, hormone, metabolite, vitamine ... (Serva, 2019)

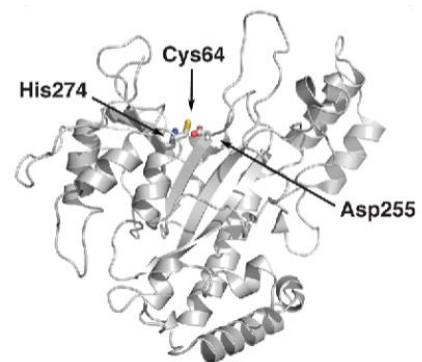
BSA se pogosto uporablja tudi za določanje količine drugih proteinov s primerjanjem neznane količine proteina z znanimi količinami BSA, v npr. Bradfordovi metodi za določevanje totalnih beljakovin. (Zor in sod., 1996, str. 303).

Slika 3: BSA
(<https://goo.gl/zAHprP>)

2.1.4. Encim transglutaminaza (TGM)

TGM je encim, ki katalizira reakcijo zamreženja proteinov. Reakcije, ki jih katalizira encim transglutaminaza, povzročajo pomembne spremembe v fizikalnih in kemijskih lastnostih proteinov, kot so npr. sprememba viskoznosti, termične stabilnosti, elastičnosti, odpornosti proteinov ... (Jančič, 2017, str. 8)

Kot biokatalizatorji se transglutaminaze uporabljajo tako v živilski kot tudi neživilski industriji. TGM, natančneje faktor XIII, ki ga najdemo v človeški krvi, pomaga ustaviti krvavitev z zamreženjem fibrinskih molekul in stabiliziranjem fibrinskih polimerov. Faktor XIII se uporablja tudi kot terapevtsko sredstvo za zdravljenje redke genetske napake pri koagulaciji krvi, ki je posledica odsotnosti TGM v krvni plazmi. (Jančič, 2017, str. 8)



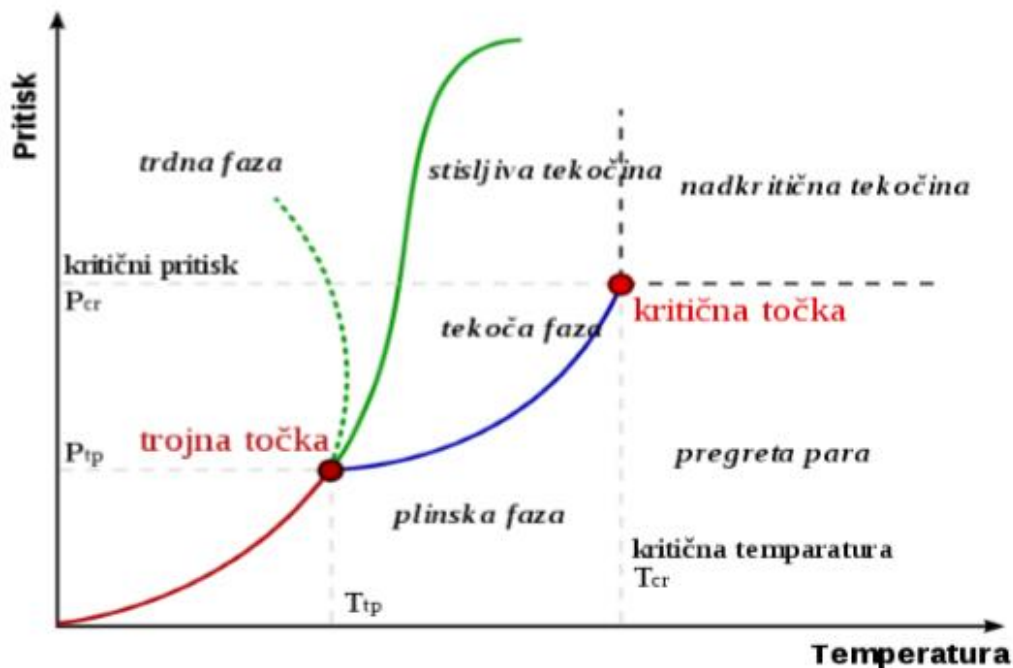
Slika 4: Struktura mikrobne transglutaminaze.
(<https://goo.gl/TCa6rU>)

2.2. Superkritični fluidi

Superkritični fluid je snov, ki je na določeni temperaturi (T_c) in določenem tlaku (P_c) nad svojo kritično točko, kjer ne obstajajo različne tekoče in plinske faze. Nad T_c in P_c je material v enotnem homogenem stanju z lastnostmi tistih med tekočino in plinom. Ko se temperatura tekočine dvigne, postane snov manj gosta, in ko se tlak plina dviguje, postane gostejša. V splošnem imajo superkritični fluidi gostote, ki so bližje tekočini, in difuzivnosti, ki so bližje plinom, kar vodi do visokih stopenj difuzije. (Joshi, 2015, str. 1)

Zaradi okoljevarstvenih problemov superkritični fluidi pogosteje nadomeščajo organska in toksična topila. Zaradi več meril se vse pogosteje uporablja $scCO_2$, saj je poceni, nevnetljiv in netoksičen. Prav tako je njegova glavna prednost, da je končni produkt suh in brez kakršnih koli ostankov CO_2 , saj ga lahko enostavno odstranimo z zmanjšanjem tlaka. Ta lastnost je zanimiva iz ekonomskega vidika, saj se izogiba številnim stopnjam čiščenja, ki se običajno izvajajo po obdelavi s strupenimi organskimi topili. (Champeau, 2015, str. 249)

Tehnologije, ki temeljijo na superkritičnih fluidih, so vključene v številne industrijske aplikacije, ki so v zadnjih letih pokazale znaten napredek. Veliko industrijskih sektorjev zajema prehrano, kozmetiko, farmacevtsko industrijo, materiale, kemijo, energijo in obdelavo odpadkov. Številni superkritični postopki vključujejo ekstrakcijo, impregnacijo, formulacijo, sterilizacijo, čiščenje, energijo in ravnanje z odpadki. (Perrut, 2000, str. 4532).



Slika 5: Fazni diagram (Kravanja, 2014, str. 19)

Stanja snovi, ki se pojavljajo pri različnih temperaturah in tlakih, je mogoče grafično povzeti v faznem diagramu, ki predstavlja krivuljo tlaka v odvisnosti od temperature. Fazni diagram vsebuje diskretne regije, ki ustrezajo trdni, tekoči in plinski fazi. Trdna in tekoča območja so ločena s talilno krivuljo snovi, tekoče in plinsko območje pa ločita krivulja parnega tlaka, ki se konča na kritični točki. V dani regiji je stabilna le ena faza, vendar sta vzdolž linij, ki ločujejo regije, dve fazi v ravnovesju pri dani temperaturi in tlaku. Vsaka regija ustreza območju kombinacij temperature in tlaka, pri katerih je ta faza stabilna. Tako kombinacija visokega tlaka in nizke temperature ustreza trdni fazi, medtem ko je plinska faza prednost pri visoki temperaturi in nizkem tlaku. (Chemistry LibreText, 2017)

CO₂ se običajno obnaša kot plin v zraku pri standardni temperaturi in tlaku/pritisku (STP) ali kot trdna snov, imenovana suhi led, ko je zamrznjen. Fazni diagram CO₂ kaže, da tekoči CO₂ ne more obstajati pri atmosferskem tlaku. Posledično se trdni CO₂ sublimira neposredno v plin. (Chemistry LibreText, 2017)

Diagram prikazuje, katero stanje snovi (trdno, tekoče, plinasto) obstaja za čiste snovi v vseh mogočih kombinacijah temperature in pritiska. Obstaja samo ena kombinacija temperature in tlaka, pri kateri vse tri faze lahko soobstajajo; ta točka je trojna točka in je za CO₂ pri temperaturi 216,6 K (-56,6 °C) in tlaku 0,518 MPa. Pod kritično temperaturo se z večanjem tlaka plin stisne in sčasoma kondenzira v veliko gostejšo tekočino. (Joshi, 2015, str. 2)

Če želimo razumeti, kaj se dogaja v kritični točki, moramo upoštevati učinke temperature in pritiska na gostoto tekočin oziroma plinov. Ko se temperatura tekočine poveča, se njena gostota zmanjša. Ko se tlak plina poveča, se njegova gostota poveča. Na kritični točki sta tekoča in plinska faza popolnoma enake gostote in obstaja samo ena faza. Ta enofazna faza se imenuje superkritični fluid, ki kaže mnoge lastnosti plina, vendar ima gostoto, ki je značilnejša za tekočino. CO₂ se širi, da zapolni posodo kot plin, vendar z gostoto, kot jo ima tekočina. (Chemistry LibreText, 2017)

3. METODOLOGIJA DELA

Iz pripravljenih materialov smo s scCO_2 pripravili kompozitni material, ki smo ga v nadaljevanju tudi analizirali. Z DSC metodo smo skušali ugotoviti, ali je nastali material zares kompozitni, si z okoljskim skenirajočim elektronskim mikroskopom (ESEM) ogledati velikosti nastalih por in izračunati poroznost. Z Bradfordovo metodo smo proučevali sproščanje testnega proteina BSA, na koncu pa nadzirali sproščanje encima transglutaminaza in njegovo aktivnost.

3.1. Material

Za izvedbo poskusa in ustvarjanje novega materiala smo potrebovali sledeče snovi/materialie:

- **goveji serumski albumin (BSA)**

BSA (CAS: 9048-46-8) je bil zagotovljen s strani Sigma-Aldrich.

- **diklorometan (DCM)**

DCM (CAS: 75-09-2) je bil kupljen pri Fluka Analytical.

- **poli (ϵ -kaprolakton) (PCL)**

PCL molske mase 10 000 g/mol (CAS: 24980-41-4) in 60 000 g/mol (CAS: 24980-41-4) sta bila dobavljena s strani Sigma-Aldrich

- **hitozan (CS)**

CS (CAS: 9012-76) 4) smo prav tako kupili pri Sigma-Aldrich.

- **transglutaminaza (TGM)**

TGM (CAS: 80146-85-6) je zagotovila Sigma Aldrich.

Polimeri so bili dostavljeni kot praški in smo jih uporabili brez nadaljnega čiščenja. Vsebnost vlage v polimerih, določena gravimetrično s pomočjo ventilatorja HB43-S Compact Halogen Moisture Analyzer, je bila nižja od 0,10 % mase vsakega polimera.

- **ogljikov dioksid CO_2**

CO_2 (99,998%) je dobavil Messer (Slovenija).

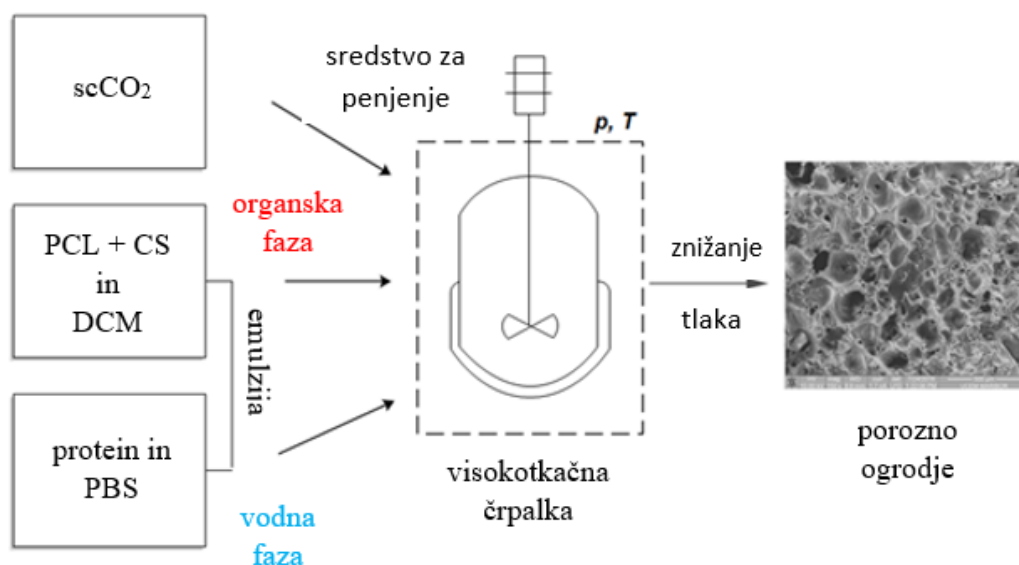
Fosfatni pufer, ki smo ga uporabljali za te poskuse, je bil sestavljen iz 0,1 M fosfatno puferirane slanice (PBS) s pH 7,4 ter antibiotika/antimikotika za preprečevanje rasti bakterij, dobljenega s podjetja Sigma. Za pripravo pufra smo potrebovali 0,144 g/L KH_2PO_4 , 9,00 g/L NaCl in 0,795 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ter 100 mL Milli-Q vode. (Hile in sod, 2000, str. 178)

3.2. Priprava poroznega ogrodja s scCO₂

Pred obdelavo s scCO₂ smo pripravili emulzijo vodne in organske faze.

Pri določanju totalnih beljakovin smo za vodno fazo uporabili 20 mg BSA v 200 μ L PBS. Organska faza je bila v tem primeru sestavljena iz 500 g PCL + CS mešanice, raztopljene v 1 μ L diklorometanu.

Za aktivnosti test je vodna faza vsebovala 12 mg proteina transglutaminaza in 200 μ L PBS. Organska faza je bila prav tako iz 500 g mešanice PCL in CH ter 1 μ L diklorometana.



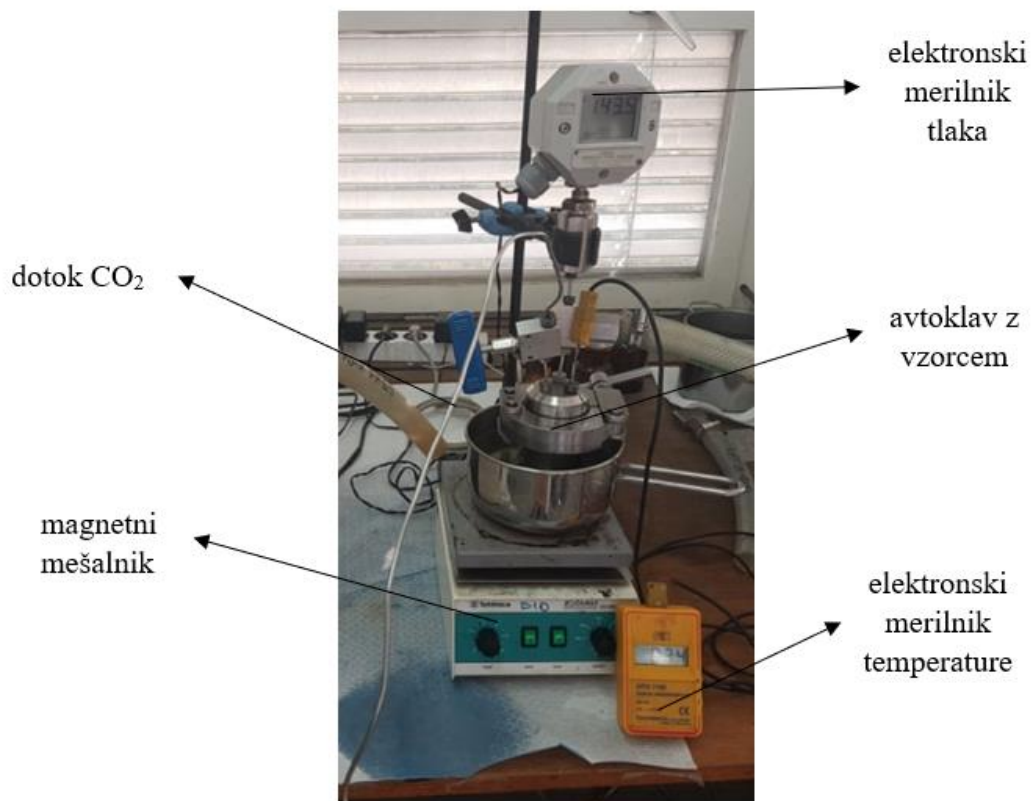
Slika 6: Poenostavljen prikaz priprave poroznega ogrodja s scCO₂.

Ker smo imeli dve nemešljivi fazi, smo lahko emulzijo vodne in organske faze tvorili s pomočjo ultrazvoka.



Slika 7: Digitalni ultrazvočni čistilnik.

Pred obdelavo s scCO₂ smo emulzijo odpipetirali v manjši cilindrični kalup in ga takoj postavili v celico za ravnanje v visokotlačnem stanju, izdelano iz nerjavečega jekla. Tlak v celici smo izmerili z elektronskim merilnikom tlaka. S pomočjo visokotlačne črpalke se je tlak povečal na 12 MPa, z uporabo grelnega plašča pa smo ohranjali konstantno temperaturo 37 °C. Odstopanje tlaka je bilo ±0,01 MPa, celotno temperaturno odstopanje pa 0,1 °C. Ko je CO₂ dosegel želeni delovni tlak, smo s pomočjo črpalke skozi visokotlačni reaktor spustili tok CO₂ s hitrostjo 20 mL/h, da se je v celoti ekstrahiralo organsko topilo iz predhodno pripravljene emulzije. Ekstrahirali smo 18 ur. Biorazgradljiv polimer se je pod visokim tlakom utekočinil, tako da so se netopni biorazgradljivi delci vanj ujeli in po znižanju tlaka ostali v strjenem materialu. Po drastičnem znižanju tlaka se je nastala polimerna pena odstranila iz kalupa in se za nadaljnjo raziskavo sproščanja beljakovin razdelila na tri dele po 50 mg. Vsak vzorec smo nato shranili v svojo mikrocentrifugirko (epico), napolnjeno s predhodne pripravljenim PBS. Epice so bile ves čas inkubirane pri temperaturi 37 °C, prav tako pa se je PBS pogosto menjaval. (Hile in sod., 2000, str. 179, 180)



Slika 8: Priprava za obdelavo s scCO₂.

3.3. Diferencialna dinamična kalorimetrija (DSC)

DSC je tehnika termične analize, ki se uporablja že več kot dve desetletji za merjenje temperatur in toplotnih tokov, povezanih s prehodi v materialih kot funkcijo časa in temperature. Tako vzorec kot referenca se vzdržujeta pri skoraj enaki temperaturi v celotnem poskusu. Na splošno je temperaturni program za DSC analizo zasnovan, da se temperatura nosilca vzorca linearno poveča kot funkcija časa. Referenčni vzorec mora imeti dobro določeno toplotno zmogljivost v razponu temperatur, ki jih je treba ovrednosti. (Gill in sod, 1993, str. 931)

DSC smo izvedli na čistem PCL ($M_w=10\ 000$ g/mol in $60\ 000$ g/mol) in na pripravljenih kompozitnih ogrodjih, da potrdimo sestavo PCL in CS ter določimo odstotek kristaliničnosti. Vzorce smo postavili v zaprte aluminijaste posode. Meritve so potekale pri sobnem tlaku in pri temperaturnem območju od $25\ ^\circ\text{C}$ do $600\ ^\circ\text{C}$ s temperaturno hitrostjo $10\ ^\circ\text{C}/\text{min}$. Na osnovi DSC krivulj smo določili temperaturo taljenja (T_m), toploto taljenja (ΔH_m) in kristaliničnost vzorcev. Kristaliničnost zloma PCL (X_c) v vzorcih smo izračunali z enačbo (1) (Markočič in sod., 2018, str. 15596):

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^\circ \cdot w} \times 100 \quad (1)$$

kjer je:

ΔH_m ... specifična talilna entalpija vzorca

ΔH_m° ... talilna entalpija 100 % kristalinični PCL (76,9 J/g)

w ... teža frakcije PCL v mešanici

3.4. Okoljski skenirajoč elektronski mikroskop (ESEM)

Velikost por za nastala kompozitna ogrodja, ki so nastala s scCO_2 , je bila določena z uporabo okoljske skenirajoče elektronske mikroskopije (ESEM) Quanta 200 3D, katere namen je izdelati slike površinskih značilnosti pri zelo velikih povečavah ($100\times$ do $100\ 000\times$) pod variabilnim stanjem vakuumu (vodni tlak) v komori vzorca. Vzorce lahko pregledamo pod podobnimi pogoji, kot so bili v vzorcu v naravi (»okoljski« pogoji). (Manero in sod, 2003, str. 469)

3.5. Poroznost materiala

Poroznost pripravljenih kompozitnih ogrodij smo izmerili z merilnim valjem, izračunali pa po naslednji enačbi (2) (Y. Wan in sod., 2008, str. 1737):

$$\text{Porosity (\%)} = \frac{(w_2 - w_3 - w_s) / \rho_e}{(w_1 - w_3) / \rho_e} \times 100 \quad (2)$$

kjer je:

w_1 ... teža merilnega valja, napolnjenega z etanolom

w_2 ... teža merilnega valja, etanola in poroznega ogrodja

w_3 ... teža merilnega valja, napolnjenega z etanolom, po odstranitvi poroznega ogrodja

w_s ... teža poroznega ogrodja

ρ_e ... gostota absolutnega etanola, uporabljenega pri analizi

3.6. Bradfordova metoda za določevanje totalnih beljakovin

Bradfordova metoda je natančna in hitra spektrofotometrična metoda, ki se uporablja za merjenje koncentracije beljakovin v dani raztopini. Ta metoda potrebuje le en reagent, in sicer kislno raztopino barvila Coomassie Brilliant Blue G-250. (Cheng in sod, 2016, str. 38)

○ Priprava Bradfordovega reagenta

Bradfordov reagent smo pripravili, tako da smo raztopili 100 mg Coomassie Brilliant Blue v 50 mL 95 % etanola in v 100 mL 85 % fosforne (V) kisline (H_3PO_4), na koncu pa še razredčili z Milli-Q vodo do oznake 1 L.

○ Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili protein albumin (BSA) v koncentracijskem območju od 0 do 1 mg/mL.

Pripravili smo različne koncentracije albumina. Natehtali smo 10 mg albumina in dodali 1 ml Milli-Q vode.

10 mg/ml → razredčeno po naslednjem principu:

samo Milli-Q voda (Blank) → 0,0 mg/mL

20 µL albumina (10 mg/mL) + 980 µL Milli-Q vode → 0,2 mg/mL

40 µL albumina (10 mg/mL) + 960 µL Milli-Q vode → 0,4 mg/mL

60 µL albumina (10 mg/mL) + 940 µL Milli-Q vode → 0,6 mg/mL

80 µL albumina (10 mg/mL) + 920 µL Milli-Q vode → 0,8 mg/mL

100 µL albumina (10 mg/mL) + 900 µL Milli-Q vode → 1,0 mg/mL

○ Priprava vzorcev za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu

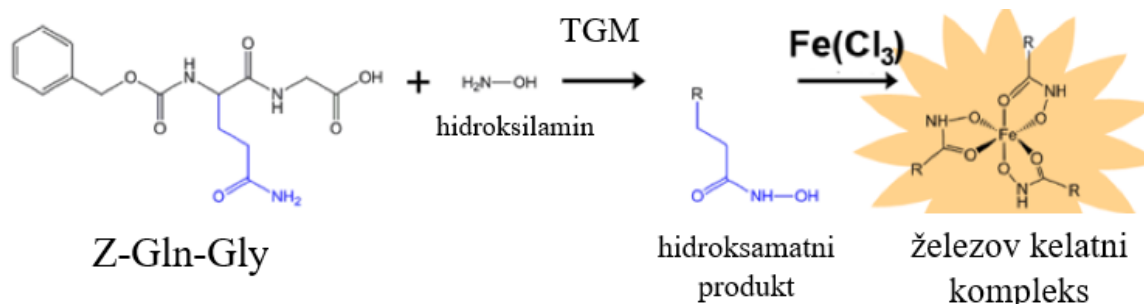
V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1 mL Bradfordovega reagenta in dodali 20 µL izbranega vzorca. V slepi vzorec smo namesto vzorca k 1 µL reagenta dolili 20 µL Milli-Q vode. V obeh primerih smo potem mikrocentrifugirke vorteksirali, 15 minut, inkubirali na sobni temperaturi in merili absorbanco pri 595 nm.



Slika 9: Slika vzorcev za enkapsuliran BSA

3.7. Encimski test za encim transglutaminazo

Aktivnost transglutaminaze smo določali spektrofotometrično. Aktivnostni test za transglutaminazo temelji na uporabi substrata Z-Gln-Gly kot amin akceptorja in hidroksilamina kot amin donorja. V prisotnosti TGM se tvori Z-glutamihidroksamat-glicin, ki tvori barvni kompleks z železom (III), tega pa zaznamo na valovni dolžini 525 nm. (Jančič, 2017, str. 31)



Slika 10: Reakcija, ki jo katalizira transglutaminaza.
(Rachel in sod., 2017, str. 2271)

o Priprava reagentov

Za določanje aktivnosti transglutaminaze smo potrebovali osem reagentov:

- I. REAGENT A – 1 M Tris pufer (Trisma Base)
Pripravili smo ga tako, da smo raztopili 6,057 g Trisma Base v 50 mL destilirane vode in z etanojsko kislino uravnali pH na 6 pri 37 °C.
 - II. REAGENT B – Z-Gln-Gly (ZEDIRA)
Zatehtali smo 0,12 g Z-Gln-Gly,
 - III. REAGENT C – 0,200 M hidrosilamin in 0,020 M glutation
Zatehtali smo 0,0695 g hidrosilamina in 0,0307 g glutationa ter ju raztopili v 5 mL destilirane vode. Vsak dan je bilo potrebno pripraviti svežo raztopino.
 - IV. REAGENT D – 1 M raztopina kalcijevega klorida (CaCl₂)
V 10 mL destilirane vode smo raztopili 1,1099 g CaCl₂.
 - V. REAGENT E – 0,010 M raztopina L-glutaminske kisline γ -monohidroksamata
V 10 mL destilirane vode smo raztopili 0,0162 g L-glutaminske kisline γ -monohidroksamata.
 - VI. REAGENT F – 12 % raztopina trikloroocetne kisline (TCA)
V 100 mL destilirane vode smo raztopili 12 g TCA.
 - VII. REAGENT G – 5 % raztopina železovega (III) klorida heksahidrata (FeCl₃•6H₂O)
V 100 mL reagenta H smo raztopili 5 g FeCl₃•6H₂O.
 - VIII. REAGENT H – 0,1 M klorovodikova kislina (HCl)
V 100 mL bučko smo odpipetirali 0,8281 mL 37 % HCl in razredčili z destilirano vodo do oznake.
- + REAGENT I – raztopina encima transglutaminaza

○ **Postopek določevanja aktivnosti transglutaminaze**

Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico, tako da smo natehtali 0,12 g reagenta B, mu dodali 2 mL reagenta A in 5 mL reagenta C. Nato smo pripravljeno mešanico ob rahlem segrevanju mešali z magnetnim mešalom, dodali 50 µL reagenta D in nadaljevali z mešanjem z magnetnim mešalčkom. Ko se je ves reagent D raztopil, smo z 1 M NaOH naravnali pH na 6 pri temperaturi 37 °C in z destilirano vodo dopolnili volumen do 10 mL.

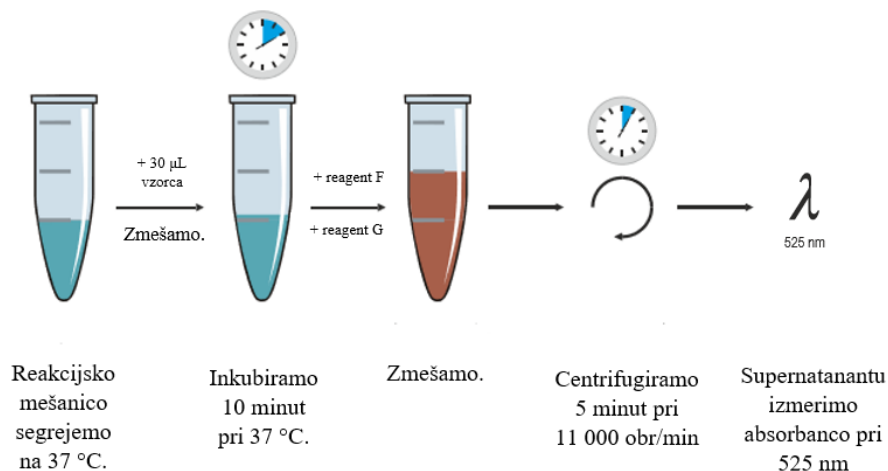
V **tabeli 1** sta prikazani količina in zaporedje dodajanja ostalih reagentov za vzorec, slepi vzorec, standard in slepi vzorec standarda:

Tabela 1: Zaporedje in količina dodajanja reagentov za določanje aktivnosti encima transglutaminazo.

	VZOREC	SLEPI VZOREC	STANDARD	SLEPI VZOREC STANDARD
reakcijska mešanica	200 µL	/	/	/
inkubacija pri 37 °C				
reagent I	30 µL	/	/	/
vorteksacija in inkubacija 10 minut pri 37 °C				
destilirana voda	/	/	/	100 µL
reakcijska mešanica	/	200 µL	/	/
reagent E	/	/	100 µL	/
reagent F	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
reagent I	/	30 µL *	/	/
vorteksacija				
reagent G	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

*Dodamo, kadar merimo prosti encim.

Ko smo dodali vse ustrezne reagente, smo izbrani vzorec ponovno vorteksirali, pet minut centrifugirali pri 11 000 rpm in merili absorbanco pri valovni dolžini 525 nm.



Slika 11: Postopek dodajanja reagentov. (Jančič, 2017, str. 33)

o Izračun aktivnosti encima transglutaminaza

Aktivnost encima transglutaminaza, kjer ena enota (U oz. unit) encima tvori med reakcijo hidrosilamina in Z-Gln-Gly 1 µmol hidrosamata na minuto pri 37 °C in pH 6, smo izračunali po sledeči enačbi (3) (Jančič, 2017, str. 34):

$$\text{aktivnost encima} = \frac{(A_{vz} - A_{vy\ blank}) \cdot 1,23 \cdot df}{(A_{std} - A_{std\ blank}) \cdot 1,1 \cdot 10} \quad (3)$$

kjer je:

aktivnost encima ... aktivnost TGM (U/mL)

A_{vz} ... absorbanca vzorca pri 525 nm

$A_{vz\ blank}$... absorbanca slepega vzorca pri 525 nm

A_{std} ... absorbanca standarda pri 525 nm

$A_{std\ blank}$... absorbanca slepega vzorca standarda pri 525 nm

df ... faktor redčenja

1,23 ... volumen barvnega miksa

1,1 ... volumen standarda

10 ... čas reakcije

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

Za potrditev kompozitne sestave smo preliminarno izmerili dobljenim biomaterialom tališča z DSC analizo. Morfologijo in poroznost smo preučili na ESEM. Nato smo iz pripravljenih kompozitnih materialov merili sproščanje proteina BSA ter ujetega encima TGM in njegovo aktivnost.

4.1. DSC analiza

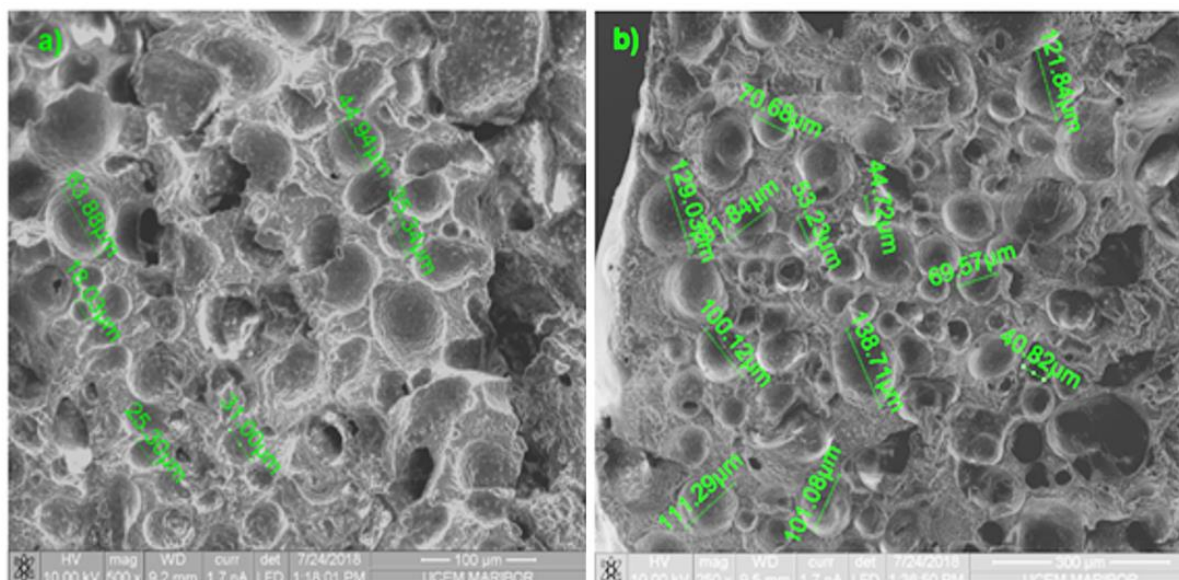
DSC analizo smo izvedli na dveh čistih PCL z različno molsko maso ($M_w=10\ 000$ in $60\ 000$ g/mol) in na nastalem materialu po obdelavi s CO_2 , da potrdimo sestavo zmesi med PCL in CS. Kot je razvidno iz **tabela 2**, je bilo tališče obeh kompozitov nižje od tališča čistega PCL, s čimer smo potrdili nastanek novega kompozitnega materiala in dobro mešljivost med PCL in CS. Ugotovili smo, da se tališče kompozitov zmanjšuje s povečanjem koncentracije CS v mešanici. Kompozitni material z molsko maso PCL $10\ 000$ ima višjo kristaliničnost kot kompozit z molsko maso PCL $60\ 000$. Pri temperaturi približno $420\ ^\circ\text{C}$ smo opazili razgradnjo materialov in v nasprotju s čistim PCL lahko dosežemo rahlo zmanjšanje temperature razgradnje kompozitov.

Tabela 2: Temperature tališč in specifične talilne entalpije:

material	T_m ($^\circ\text{C}$)	ΔH_m (J/g)
PCL 10 000	67,58	71,31
PCL 10 000 + 5 % CS	62,88	65,17
PCL 60 000	73,04	66,62
PCL 60 000 + 5 % CS	66,23	55,04

4.2. ESEM analiza in poroznost

Slika 12 (a in b) prikazuje ESEM mikrograf PCL in CS ogrodij, penjenih s scCO_2 pri $12\ \text{MPa}$ in $37\ ^\circ\text{C}$. Analiza ESEM je pokazala, da imajo porozne konstrukcije zaprte celične strukture, ki omogočajo večjo žilavost ter manjšo prepustnost. Premeri por so od 50 do $130\ \mu\text{m}$ v primeru PCL $10\ 000 + 5\ \%$ CS; in od 40 do $140\ \mu\text{m}$, ko smo analizirali PCL $60\ 000 + 5\ \%$ CS, zato se štejejo nastale pore za mikropore (**tabela 3**). Pri hitrejšem zniževanju tlaka je možno ustvariti več por, vendar z nezaželenimi manjšimi. Poroznost je bila izračunana z enačbo 2. V obeh kompozitnih materialih je bila poroznost razmeroma visoka, in sicer nad $75\ \%$. Biomateriali s poroznostjo večjo kot $70\ \%$ in velikostjo por okoli $100\ \mu\text{m}$ so potrebni, da se omogoči vaskularizacija in rast tkiva. (Fanovich in sod, 2013, str. 48)



Slika 12: Elektronska mikroskopska slika za a) PCL 10 000 + 5 % CS in b) PCL 60 000 + 5 % CS.

Tabela 3: Priprava biološko razgradljivih kompozitnih materialov (37 °C in tlaku 15 MPa):

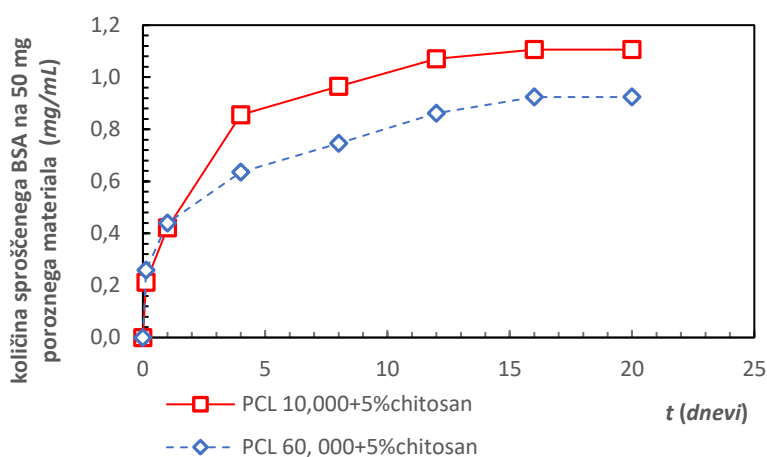
kompozit	molska masa (g/mol)	stopnja zmanjševanja tlaka (MPa/s)	intervali velikosti por (µm)	poroznost (%)
PCL 10 000 + 5 % CS	10 000	0,1	50-130	80,1
PCL 60 000 + 5 % CS	60 000	0,1	40-140	75,1

Po opravljeni DSC in ESEM analizi lahko ugotovimo, da smo z uporabo scCO₂ res dobili nove porozne kompozitne materiale. Poroznost je bila dokazana z uporabo ESEM analize in izračuni, kompozitnost pa z DSC metodo. Tako lahko zaključimo, da smo uspešno potrdili hipotezo 1.

Z ESEM analizo nismo le dokazali poroznosti nastalega kompozitnega materiala, ampak tudi različne velikosti novonastalih por. V primeru kompozita PCL 10 000 + 5 % CS je bil interval velikosti por med 50 in 130 µm, v drugem kompozitu pa med 40 in 140 µm. Tako vidimo, da velikosti nastalih por niso razporejene enakomerno, kot smo predhodno predvidevali, tako da lahko ovržemo hipotezo 2.

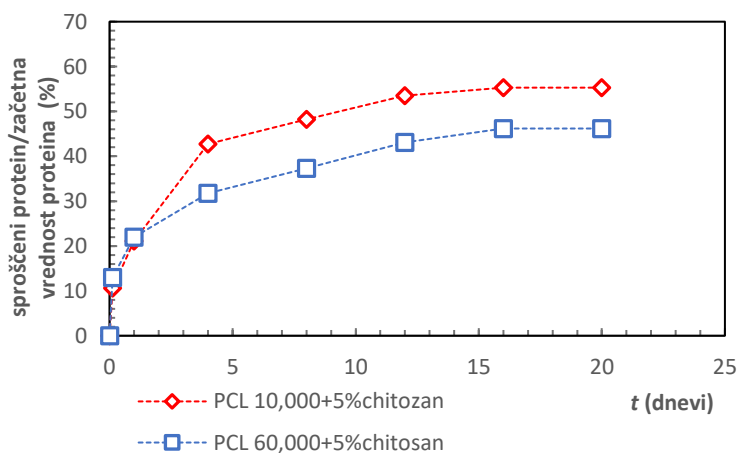
4.3. Sproščanje proteina BSA

Sproščanje totalnih beljakovin smo ocenili za porozno ogrodje, sestavljeno iz PCL 10 000 + 5 % CS, ter PCL 60 000 + 5 % CS porozno ogrodje, tako da smo vsako razdelili na tri enake dele (vsak del je tehtal 50 mg). Preučevali smo vpliv molekulske mase PCL in časa sproščanja beljakovin iz kompozitnih polimerov na skupno koncentracijo sproščene BSA.



Slika 13: Količina sproščene BSA na 50 mg poroznega materiala.

Kot je prikazano na **sliki 13**, so porozna ogrodja, polna BSA, pokazala dvostopenjska profila sproščanja. Večje koncentracije beljakovin so bile sproščene v prvih nekaj dneh iz obeh raziskanih vzorcev, nato pa je bilo sproščanje beljakovine konstantno, saj se je celotna koncentracija beljakovin linearno povečevala s povečanjem časa sproščanja. Glavni delež beljakovin iz poroznega ogrodja na osnovi PCL je bil sproščen v prvih 16 dneh. Po tem času so bile koncentracije beljakovin v PBS raztopinah nič ali zanemarljivo majhne ne glede na testiran kompozit. Višje celotno sproščanje beljakovin smo opazili pri ogrodju PCL 10 000 + 5 % CS v nasprotju z ogrodjem PCL 60 000 + 5 % CS. To je lahko povezano s poroznostjo ogrodja, ki je za približno 5 % višja v primeru PCL 10 000 + 5 % CS. Z višjo poroznostjo se lahko ujeti BSA v mikroporah zlahka prostijo.



Slika 14: Odstotki sproščene proteina.

Sprostitev BSA je bila normalizirana na začetno beljakovino, ujeta v porozno ogrodje, kot je prikazano na **sliki 14**. Na začetku sproščanje beljakovin za oba porozna materiala sledi isti krivulji in po štirih dneh sproščanja beljakovin PCL 10 000 + 5 % CS kaže boljši profil sproščanja, kar lahko pripišemo boljši poroznosti materiala. 58,8 % beljakovin se je sprostil iz kompozita s PCL ($M_w = 10\ 000\ \text{g/mol}$) in 43,9 % iz kompozita s PCL ($M_w = 60\ 000\ \text{g/mol}$) po 16 ali 20 dneh testiranja sproščanja beljakovin.

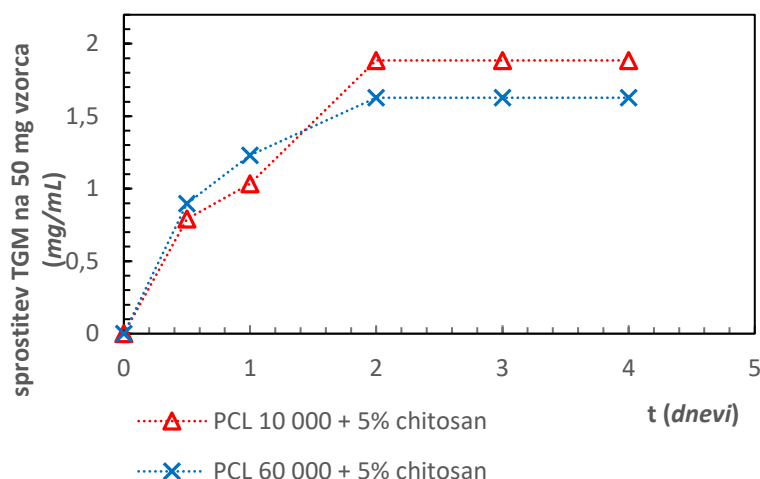
Tabela 4: Koncentracije proteina, sproščenega iz treh enako velikih delov.

čas (dan)	koncentracija proteina v prvem delu poroznega materiala (mg/mL)	koncentracija proteina v drugem delu poroznega materiala (mg/mL)	koncentracija proteina v tretjem delu poroznega materiala (mg/mL)	povprečna koncentracija proteina (mg/mL)	Skupne koncentracije sproščenega proteina (mg/mL)
PCL 10 000 + 5 % CS					
0	0	0	0	0	0
0,125	0,249	0,204	0,205	0,219	0,219
1	0,169	0,162	0,320	0,217	0,436
4	0,113	0,680	0,550	0,448	0,883
8	0,106	0,291	0,121	0,173	1,056
12	0,122	0,144	0,096	0,121	1,177
16	0	0	0	0	1,177
20	0	0	0	0	1,177
PCL 60 000 + 5 % CS					
0	0	0	0	0	0
0,125	0,385	0,118	0,302	0,268	0,268
1	0,090	0,103	0,281	0,158	0,426
4	0,123	0,398	0,152	0,225	0,651
8	0,108	0,115	0,121	0,115	0,765
12	0,018	0,079	0,080	0,113	0,878
16	0,060	0,068	0,083	0,070	0,949
20	0	0	0	0	0,949

Z Bradfordovo metodo smo spremljali sproščanje proteina BSA iz nastalega kompozitnega materiala. Po celotni analizi lahko potrdimo hipotezo 4, saj je bilo sproščanje enkapsuliranega testnega proteina BSA skozi porozni material zares kontrolirano.

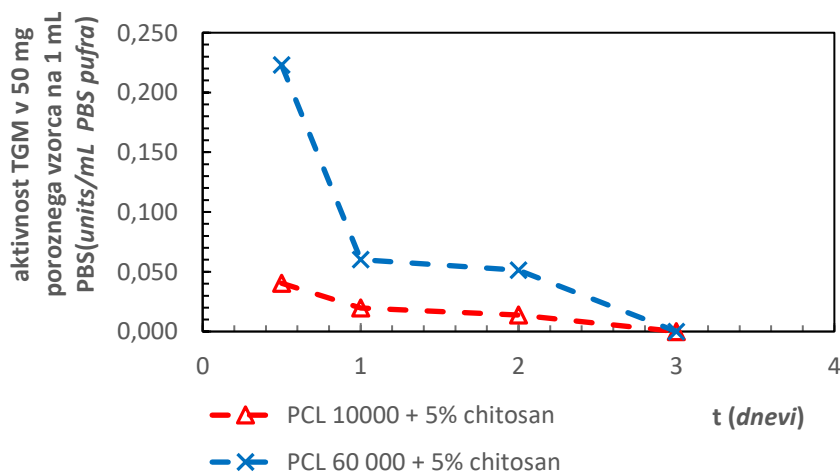
4.4. Sproščanje in aktivnost encima transglutaminaza

Encim transglutaminaza smo enkapsulirali v porozno matrico po podobnem postopku kot za primer modelnega proteina BSA. Pripravljen vzorec smo po superkritični obdelavi razdelili na tri 50 mg dele, jih potopili v 1 mL fosfatnega pufru in jih pustili inkubirati pri 37 °C. Nato smo po določenih časovnih obdobjih s pipeto vzeli 20 μ L fosfatne raztopine, v katero se je izločila transglutaminaza, in opravili potrebne analize.



Slika 15: Sprostitev TGM na 50 mg vzorca.

Slika 15 prikazuje dva profila sproščanja transglutaminaze iz pripravljenih kompozitnih materialov. Za oba kompozitna materiala (PCL 10 000 g/mol + 5 % CS in PCL 60 000 g/mol + 5 % CS) lahko zaključimo, da imata podoben profil sproščanja encima transglutaminaza - po dveh dneh se je fizikalno ujela transglutaminaza v celoti izločila skozi porozni material. V tem času lahko tudi pričakujemo, da ima biomaterial potencialno terapevtsko delovanje (bo pospeševalo celjenje oz. ga kataliziralo).



Slika 16: Aktivnost TGM na 50 mg poroznega vzorca.

Slika 16 prikazuje aktivnost ujetе transglutaminaze v 50 mg poroznega materiala na 1 mL fosfatnega pufra. V obeh primerih kompozitnih materialov vidimo, da je aktivnost najvišja po 12. urah in potem počasi pada. Večjo aktivnost ujetе transglutaminaze ima mešanica 60 000 g/mol PCL in 5 % CS. Izgubo aktivnosti bi lahko argumentirali z močnejšim vplivom zunanjih dejavnikov (npr. temperature, svetlobe, neustreznega pufra ...).

Tabela 5: Rezultati sproščene transglutaminaze in njene aktivnosti

dnevi/vzorec	PCL 10 000 + 5 % CS	PCL 60 000 + 5 % CS	PCL 10 000 + 5 % CS	PCL 60 000 + 5 % CS
	sprostitev TGM	sprostitev TGM	aktivnost TGM	aktivnost TGM
0	0	0		
0,5	0,792	0,897	0,040	0,223
1	1,033	0,229	0,020	0,060
2	1,885	1,627	0,034	0,051
3	1,885	1,627	0	0
4	1,885	1,627	0	0

S scCO₂ smo ustvarili kompozitni material in spremljali sproščanje v njem ujetega proteina BSA ter encima transglutaminaza, tako da lahko povzamemo, da s to metodo nismo uničili ujetih proteinov, in lahko potrdimo hipotezo 3.

Z encimskim testom za transglutaminazo smo proučevali sproščanje predhodno omenjenega encima in njegovo aktivnost. Kot smo predvidevali v hipotezi 5, se je encim transglutaminaza res sproščal kontrolirano skozi porozni material, saj smo njegovo sproščanje lahko nadzirali, tako da lahko potrdimo tudi to hipotezo.

Za encim transglutaminaza vemo, da ima v času sproščanja terapevtsko delovanje. Encim transglutaminaza se je iz našega kompozitnega materiala sicer sproščal le dva dneva, ampak je kljub temu imel terapevtsko delovanje. Tako lahko potrdimo še zadnjo, šesto hipotezo.

5. ZAKLJUČEK

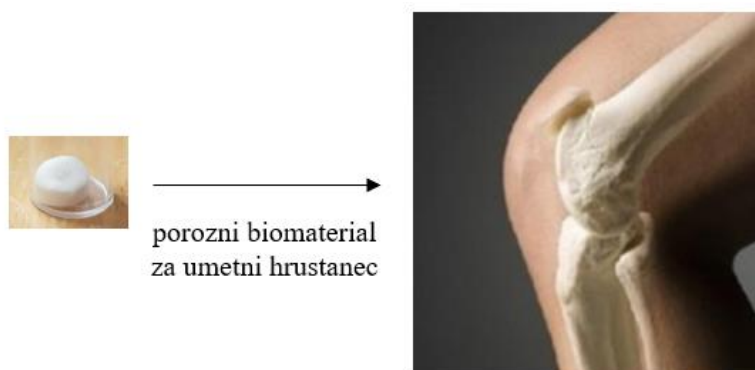
V raziskovalni nalogi smo pripravili kompozitne materiale iz sintetičnega polimera PCL in naravnega CS, v katere smo ob uporabi $scCO_2$ ujeli protein BSA in v drugi fazi encim transglutaminazo. Izvedli smo karakterizacijo novonastalih poroznih materialov z namenom dokazati kompozitno sestavo. Z DSC analizo smo potrdili mešljivost PCL in CS in nastanek kompozitnega materiala z znižanjem točke tališča kompozita napram čistemu materialu PCL. Z ESEM smo pokazali, da ima dobljeni porozni material celično strukturo z visoko poroznostjo. Z enkapsulacijo proteina BSA smo ugotovili, da je bila večja koncentracija proteina sproščena že v prvih dneh; sproščanje smo sicer opazovali do 20. dne, ko spremembe v izločenem proteinu niso bile več opazne. Se je pa sprostilo do 60 % vgrajenega proteina. V primeru encima transglutaminaza je bil profil sproščanja nekoliko hitrejši. Terapevtski encim transglutaminaza se je iz porozne matrice izločil že v nekaj dneh in takrat ohranjal terapevtsko delovanje (aktivnost).

Po eksperimentalnem delu smo lahko potrdili pet od prvotno zastavljenih hipotez – potrdili smo, da lahko z uporabo $scCO_2$ nastanejo novi kompozitni materiali in da ta metoda ni vplivala na uničenje ujetih proteinov. Prav tako smo potrdili, da sta se testni protein BSA ter enkapsulirani encim transglutaminaza sproščala kontrolirano skozi porozni material ter da je imel slednji večdnevno terapevtsko delovanje. Smo pa ovrgli drugo hipotezo, saj poroznost kompozitnih materialov ni bila enakomerna oz. pore niso bile enakomerno porazdeljene. S to metodo je težje doseči enakomerno porazdelitev por, lahko pa bi jo izboljšali s spremembo temperature ali tlaka.

V prihodnje bi bilo smiselno skupaj enkapsulirati protein BSA in encim transglutaminazo ali pa dodati zamreževalec (npr. glutaraldehid), da bi podaljšali aktivnost transglutaminaze in s tem njeno terapevtsko delovanje.

Prav tako bi lahko merili biorazgradljivost materiala po določenem času – sprememba mase biomateriala v fosfatnem pufru bi dokazala, da se material v njem raztaplja.

Zanimiva bi bila tudi integracija poroznega biomateriala, ki bi imel enkapsulirane terapevtske encime, in žive celice, da bi ugotovili biokompatibilnost in možnost uporabe v tkivnem inženiringu (npr. za umetni hrustanec ali umetno kost).



Slika 17: Porozni biomaterial za umetni hrustanec.

6. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Tkivni inženiring je precej mlado in neraziskano področje, ki se je šele pred kratkim začelo razvijati. Znanja, pridobljena s tega področja, lahko ključno vplivajo na življenja ljudi in jim jih olajšajo. Tako smo tudi mi iz sintetičnega in naravnega polimera ustvarili biorazgradljiv kompozitni material, ki bi potencialno lahko pripomogel k razvoju tkivnega inženiringa, saj se zaradi številnih nesreč v današnjih časih povpraševanje po novih/nadomestnih organih in tkivih veča. S takšnim materialom bi lahko nadomestili potrebni organ ali tkivo, hkrati pa je njegova prednost enostavna izločitev iz telesa, ko odsluži svojemu namenu. Obenem pa bi z enkapsulacijo encimov in proteinov spodbudili celjenje in celotno bolnikovo zdravljenje.

7. VIRI IN LITERATURA

Amirdivani, Shabboo, et al. "Effects of transglutaminase on health properties of food products." *Current Opinion in Food Science* (2018).

Champeau, Mathilde, et al. "Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: a review." *Journal of controlled release* 209 (2015): 248-259.

Chemistry LibreTexts. 2016. Phase diagrams (elektronski vir). Dostopno na spletnem naslovu:

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Physical_Properties_of_Matter/States_of_Matter/Phase_Transitions/Phase_Diagrams](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Physical_Properties_of_Matter/States_of_Matter/Phase_Transitions/Phase_Diagrams) (citirano 27. januarja 2019).

Cheng, Yongfeng, et al. "Rapid method for protein quantitation by Bradford assay after elimination of the interference of polysorbate 80." *Analytical biochemistry* 494 (2016): 37-39.

Daris, Barbara & Ferik, Polonca & Markočič, Elena & Knez, Željko. (2016). Biocompatibility of supercritical carbon dioxide processed poly(lactide-co-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone) assessed with primary human osteoblasts. *Acta medico-biotechnica*.

Fanovich, Maria Alejandra, et al. "Development of polycaprolactone scaffold with antibacterial activity by an integrated supercritical extraction and impregnation process." *The Journal of Supercritical Fluids* 78 (2013): 42-53.

Gill, P. S., S. R. Sauerbrunn, and M. Reading. "Modulated differential scanning calorimetry." *Journal of Thermal Analysis* 40.3 (1993): 931-939

Hile, David D., et al. "Active growth factor delivery from poly (D, L-lactide-co-glycolide) foams prepared in supercritical CO₂." *Journal of controlled release* 66.2-3 (2000): 177-185.

Im, Su Yeon, in sod.. "Growth factor releasing porous poly (ϵ -caprolactone)-chitosan matrices for enhanced bone regenerative therapy." *Archives of pharmacal research* 26.1 (2003): 76-82.

Jančič U. 2017. Imobilizacija transglutaminaze na magnetne nanodelce, modificirane z dekstranom. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Joshi Y. 2015. A seminar report on supercritical fluids and its application. Seminar. Anmedabad, Institute of technology.

Kravanja, G. 2014. Določitev površinske napetosti z metodo kapilarnega dviga dvofaznih sistemov. Magistrsko delo. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Kravanja, Gregor in sod., "Protein release from biodegradable poly (ϵ -caprolactone)-chitosan scaffolds prepared in scCO₂" (2018).

Manero, J. M., et al. "Applications of environmental scanning electron microscopy (ESEM) in biomaterials field." *Microscopy research and technique* 61.5 (2003): 469-480.

Markočič Elena, in sod.. »Effect of Temperature and Pressure on the Behavior of Poly(ϵ -caprolactone) in the Presence of Supercritical Carbon Dioxide«, 15594-15601

Paradiž d. 2007. Biomateriali. Seminar. Ljubljana, Fakulteta za matematiko in fiziko.

Rachel, Natalie M., et al. "Engineered, highly reactive substrates of microbial transglutaminase enable protein labeling within various secondary structure elements." *Protein Science* 26.11 (2017): 2268-2279.

Periyah, Mercy Halleluyah, Ahmad Sukari Halim, and Arman Zaharil Mat Saad. "Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research." *Pharmacognosy reviews* 10.19 (2016): 39.

Sarasam, Aparna, and Sundararajan V. Madihally. "Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications." *Biomaterials* 26.27 (2005): 5500-5508.

ScienceDaily. 2018. Material Science (elektronski vir). Dostopno na spletnem naslovu: https://www.sciencedaily.com/terms/materials_science.htm (citirano 26. januarja 2019).

SERVA. 2018. Albumin Bovine (elektronski vir). Dostopno na spletnem naslovu: https://www.serva.de/enDE/ProductDetails/52_11920_Albumin_Bovine_cryst_lyophil_0_0.html (citirano 27. januarja 2019).

Sheridan, M. H., et al. "Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery." *Journal of controlled release* 64.1-3 (2000): 91-102.

Šega K. 2018. Razvoj in vrednotenje temperaturno odzivnih hidrogelov iz hitosana in glicerofosfata. Magistrska naloga. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo.

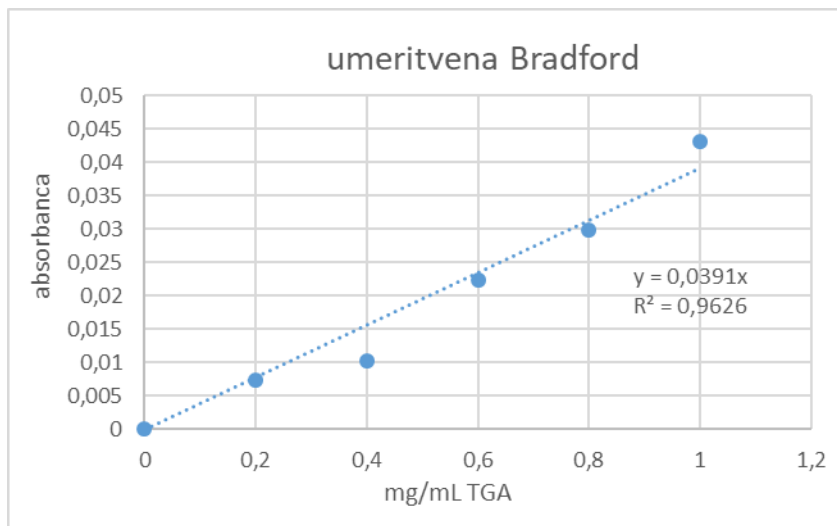
Periyah, Mercy Halleluyah, Ahmad Sukari Halim, and Arman Zaharil Mat Saad. "Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research." *Pharmacognosy reviews* 10.19 (2016): 39.

Perrut, Michel. "Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issues." *Industrial & engineering chemistry research* 39.12 (2000): 4531-4535.

Zor, Tsaffrir, and Zvi Selinger. "Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies." *Analytical biochemistry* 236.2 (1996): 302-308.

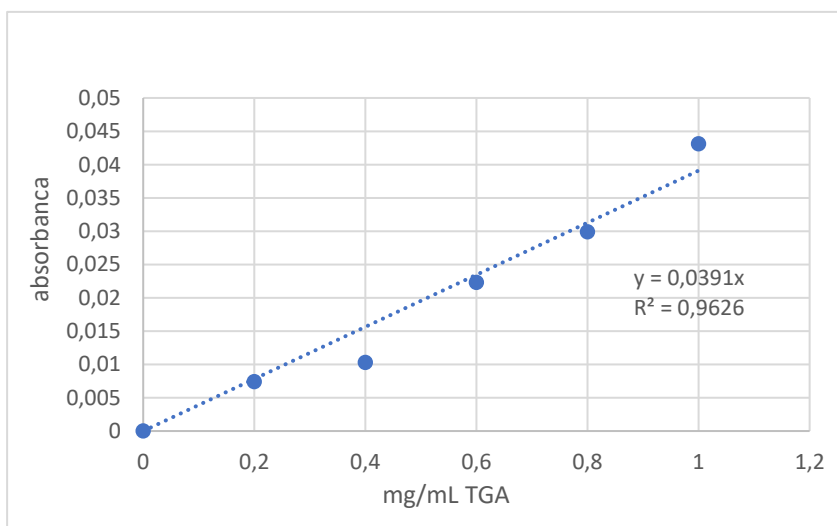
Y. Wan et al. / *Polymer Degradation and Stability* 93 (2008) 1736–1741

8. PRILOGE



c (mg/mL)	absorbanca povprečje
0	0
0,2	0,0943
0,4	0,2203
0,6	0,3179
0,8	0,4308
1	0,5279

Priloga 1: Umeritvena krivulja za BSA.



c (mg/mL)	absorbanca povprečje
0	0
0,2	0,0943
0,4	0,2203
0,6	0,3179
0,8	0,4308
1	0,5279

Priloga 2: Umeritvena krivulja za encim transglutaminaza.