Elektro modulacija kompozitnih filmova kitozan-ugljične nanocijevi za kontrolirano otpuštanje inzulina

Janić, Klaudija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:137278

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Klaudija Janić

Elektro modulacija kompozitnih filmova kitozan-ugljične nanocijevi za kontrolirano otpuštanje inzulina

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istračivački smjer

Klaudija Janić

Elektro modulacija kompozitnih filmova kitozan-ugljične nanocijevi za kontrolirano otpuštanje inzulina

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
Neposredni voditelj: Pavo Živković, mag. chem.

Osijek, 2021.

Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem svom mentoru, doc. dr. sc. Aleksandru Sečenjiju, na ukazanom povjerenju pri odabiru teme za ovaj diplomski rad. Hvala na strpljenju i razumijevanju. No, još i više, na prenesenom entuzijazmu i ljubavi prema kemiji. Za to Vam najviše hvala!

Zahvaljujem se neposrednom voditelju, Pavi Živkoviću, koji je, uz mentora, bio dio svakog koraka izrade ovoga rada. Hvala na Vašoj volji, trudu i strpljenju!

Posebno hvala mami, tati i bratu Robertu na vašoj beskrajnoj podršci, ljubavi i razumijevanju. Hvala vam što konstantno, uporno i bez iznimke vjerujete u mene. Zbog vas sam danas ovdje!

I konačno, hvala mojim prijateljicama Veroniki i Eleni na podršci. Uz vas svaki problem postaje malo manji, a svi snovi malo veći.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA Diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

Elektromodulacija kompozitnih filmova kitozan-ugljične nanocijevi za kontrolirano otpuštanje inzulina

Klaudija Janić

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku;

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Neposredni voditelj: Pavo Živković, mag. chem.

Sažetak: Dijabetesu tipa 1 uzrok je apsolutni nedostatak lučenja inzulina. Inzulin se trenutno može davati pacijentu jedino parenteralno odnosno injekcijom ili infuzijom u potkožno tkivo. Kao alternativni način dostave inzulina u ovom je radu istražen koncept za kontrolirano otpuštanje inzulina elektromodulacijom kompozitnih filmova kitozan-ugljične nanocijevi. Kompozitni filmovi kitozan-ugljične nanocijevi sa zarobljenim inzulinom naneseni su na *screen printed carbon* elektrode *drop casting* metodom, neutralizirane 0,01 mol/L otopinom NaOH. Paralelno je ispitano otpuštanje inzulina difuzijom i elektromodulacijom, a primijenjeni potencijal za elektromodulaciju bio je -0,60 V. Metoda korištena za određivanje količine otpuštenog inzulina bila je voltametrija s linearnom promjenom potencijala (eng. *linear sweep voltametry*).

Diplomski rad obuhvaća: 56 stranica, 26 slika, 2 tablice, 31 referencu

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: elektromodulacija, inzulin, kitozanski hidrogel, linearna voltametrija, ugljične nanocijevi

Rad prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, predsjednica
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji, mentor i član
3. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić, članica
4. doc. dr. sc. Marija Jozanović, zamjena člana

Rad je pohranjen: U knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD Diploma Thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate University Study of Chemistry; Research Study
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific field: Chemistry

Electromodulation of composite chitosan-carbon nanotubes films for controlled release of insulin

Klaudija Janić

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Aleksandar Sečenji, Ph. D., assistant prof.

Immediate supervisor: Pavo Živković, mag. chem.

Abstract: Type 1 diabetes is caused by an absolute lack of insulin secretion. Insulin can currently be administered to the patient only parenterally i.e., by injection or infusion into the subcutaneous tissue. As an alternative mode of insulin delivery, this master thesis investigates the concept for controlled insulin release by electromodulation of chitosan-carbon nanotube composite films. Composite films of chitosan-carbon nanotubes with loaded insulin were applied to screen-printed carbon electrodes using a drop-casting method and neutralized with NaOH. Insulin release by diffusion and electromodulation were parallelly tested, and the applied potential for electro modulation was -0.60 V. The method used to determine the amount of insulin released was linear sweep voltammetry.

Thesis includes: 56 pages, 26 pictures, 2 tables, 31 references

Original in: Croatian

Keywords: electromodulation, insulin, chitosan hydrogel, linear sweep voltammetry, carbon nanotubes

Thesis accepted:

Reviewers:

1. Martina Medvidović-Kosanović, Ph. D., Assoc. Prof., president
2. Aleksandar Sečenji, Ph. D., Assist. Prof., mentor and member
3. Mirela Samardžić, Ph. D., Assoc. Prof., member
4. Marija Jozanović, Ph. D., Assist. Prof., alternate member

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, Osijek

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. LITERATURNI PREGLED 3

2.1. DIJABETES I NJEGOVO LIJEČENJE 3

2.1.1. Dijabetes tipa 1 4

2.1.2. Dijabetes tipa 2 6

2.1.3. Drugi tipovi dijabetesa 7

2.2. INZULIN I NJEGOVA SVOJSTVA 7

2.2.1. Terapijska upotreba inzulina i njegove alternative 9

2.2.1.1. Dermalna dostava inzulina 9

2.2.1.2. Oralna dostava inzulina 10

2.2.1.3. Nazalna dostava inzulina 11

2.2.1.4.Pulmonalna dostava inzulina 12

2.3. HIDROGELOVI 12

2.3.1. Klasifikacija hidrogelova 14

2.3.1.1. Umrežavanje u hidrogelovima 15

2.3.1.2. Hidrogelovi osjetljivi na vanjske podražaje 15

2.3.1.3. Primjena hidrogelova 16

2.3.2. Hidrogelovi i kompoziti hidrogelova za elektromodulacijsko otpuštanje lijekova 16

2.3.3. Kitozan 19

2.4. UGLJIKOVE NANOCIJEVI 21

2.4.1. Karakteristike ugljikovih nanocijevi 22

2.4.2. Funkcionalizacija ugljikovih nanocijevi 24

2.4.3. Kompozit kitozana i ugljikovih nanocijevi 24

3. EKSPERIMENTALNI DIO 26

3.1. PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA KITOZANSKOG HIDROGELA 26

3.1.1. FTIR spektralna analiza kitozanskog hidrogela 26

3.1.2. Određivanje ravnotežnog udjela vode u hidrogelu 26

3.1.3.Reološka karakterizacija hidrogela 27

3.2. PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA SUSPENZIJE UGLJIKOVIH NANOCIJEVI 27

3.3. PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA KOMPOZITNOG HIDROGELA I ZAROBLJAVANJE INZULINA 28

3.4. ODREĐIVANJE RELATIVNE VISKOZNOSTI KOMPOZITA HIDROGEL-INZULIN 29

3.5. PRIPRAVA KOMPOZITA KITOZANSKI HIDROGEL–UGLJIKOVE NANOCIJEVI 31

3.6. PRIPRAVA KOMPOZITA KITOZANSKOG HIDROGELA S UGLJIKOVIM NANOCIJEVIMA I ZAROBLJAVANJE INZULINA 31

3.7. PRIPRAVA PUFERA 32

3.8. ELEKTROKEMIJSKO ODREĐIVANJE INZULINA 32

3.8.1. Amperometrijsko određivanje inzulina – kalibracijska linija 32

3.8.2. Ciklička voltametrija *33*

3.8.3 Otpuštanje inzulina *33*

3.8.3.1. Mjerenje otpuštenog inzulina amperometrijom 33

3.8.3.2. Mjerenje otpuštenog inzulina voltametrijom s linearnom promjenom potencijala (*eng*. linear sweep) 34

4. REZULTATI I RASPRAVA 36

4.1. KARAKTERIZACIJA PRIPRAVLJENOG KITOZANSKOG HIDROGELA 36

4.1.1. FTIR spektralna analiza kitozanskog hidrogela *36*

4.1.2. Određivanje ravnotežnog udjela vode u hidrogelu *37*

4.1.3. Reološka karakterizacija hidrogela *37*

4.2. PRIPRAVA KOMPOZITNOG FILMA KITOZAN–UGLJIČNE NANOCIJEVI ZA KONTROLIRANO OTPUŠTANJE INZULINA 39

4.3. ELEKTROKEMIJSKO ODREĐIVANJE INZULINA 41

5. ZAKLJUČAK 50

6. LITERATURNA VRELA 52

7. ŽIVOTOPIS 55

1. UVOD

Dijabetes je jedan od vodećih javnozdravstvenih problema i globalna epidemija suvremenog društva. Dijabetes ili *diabetes mellitus*, neizlječivi je metabolički poremećaj koji se razvija zbog nedostatka inzulina u tijelu, neosjetljivosti organizma na inzulin ili oboje. Dok kod dijabetesa tipa 2 nije potreban inzulinski tretman za preživljavanje, osobe oboljele od dijabetesa tipa 1 na kraju postaju ovisne o inzulinu kako bi preživjele i imaju rizik od ketoacidoze. U ovom kasnijem stadiju bolesti inzulin se izlučuje malo ili se uopće ne izlučuje [1].

Inzulin je dipeptid koji se sastoji od 51 aminokiseline u dva lanca koji su međusobno povezani disulfidnim vezama [2]. U gastrointestinalnom traktu dolazi do njegove iznimne degradacije kada se unese oralno, stoga se inzulin trenutno pacijentu može davati jedino parenteralno. Prema tome, injekcija ili infuzija u potkožno tkivo jedini je prihvaćeni oblik terapijske upotrebe inzulina u kliničkoj praksi. No, takva primjena je bolna, a i rukovanje sa špricama je zamorno pa se dugo radilo na razvoja modernih injekcijskih uređaja. No, osim toga, dio pažnje je bio posvećen razvoju alternativnih načina unosa inzulina [3].

Precizno otpuštanje iz uređaja za dostavu lijekova je vrlo poželjno kako bi se savladali nedostaci oralnih i injekcijskih metoda doziranja. Konvencionalne metode dovođenja lijekova u tijelo u početku isporučuju maksimalnu dozu lijeka, no ta se doza jako smanjuje nakon vrlo kratkog vremena. Dizajn sustava za dostavu lijekova bio bi idealan ako reagira na fiziološke uvjete kao što su obrazac hormonske koncentracije, tjelesna temperatura, razine glukoze u krvi, promjene u pH uvjetima i električni signali. Korištenje električnog signala za stimulaciju otpuštanja lijeka je vrlo privlačno jer je elektronika vrlo pristupačna i raznovrsna za *in vitro* istraživanja. Parametri kao što su tip pulsa, amplituda, polarnost i trajanje mogu se lako prilagoditi sustavu za dostavu lijekova u svrhu kontrole otpuštanja. Nekoliko je istraživanja pokazalo kako je električna stimulacija održiv put za poboljšanje otpuštanja lijeka. Obično su takvi sustavi za otpuštanje lijeka izrađeni od hidrogelova koji koriste električno polje kao sredstvo za aktivaciju otpuštanja [4].

Cilj ovog rada bio je izraditi novi sustav za kontrolirano otpuštanje inzulina elektrostimulacijom i dokazati ispravnost koncepta.

U prvom dijelu rada opisan je ukratko dijabetes, zatim inzulin, njegova svojstva i trenutni načini dostave inzulina u tijelo. Zatim su opisane sastavnice dizajna našega sustava za kontrolirano otpuštanje inzulina s informacijama iz literature. Tu su detaljnije opisani

hidrogelovi, njihova klasifikacija, umrežavanje, primjena te je posebno opisano elektromodulacijsko otpuštanje u hidrogelovima. Opisan je kitozan i kitozanski hidrogelovi te su opisane ugljikove nanocijevi, njihove karakteristike, karakterizacija i kompozit kitozana i ugljičnih nanocijevi, a sve kako bi se pojasnila svrha svakoga od njih u našemu sustavu.

U drugom su, eksperimentalnom dijelu, opisani materijali i metode korištene u pripremi sustava za kontrolirano otpuštanje inzulina te je detaljno opisan put dokazivanja koncepta sa svim negativnim rezultatima i promjenama koje su napravljene prije nego što smo došli do pozitivnog rezultata, odnosno dokaza koncepta.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Dijabetes i njegovo liječenje

Diabetes mellitus skupina je metaboličkih bolesti okarakterizirana hiperglikemijom koja je posljedica poremećaja u lučenju inzulina, djelovanju inzulina ili oboje. Kronična hiperglikemija dijabetesa povezana je s dugotrajnim oštećenjem, disfunkcijom i otkazivanjem raznih organa, posebice očiju, bubrega, živaca, srca i krvnih žila. Nekoliko patogenih procesa uključeno je u razvoj dijabetesa. Oni se mogu razlikovati od autoimunog uništavanja β-stanica gušterače s posljedičnim nedostatkom inzulina do abnormalnosti koje rezultiraju otpornošću na djelovanje inzulina. Osnova poremećaja u metabolizmu ugljikohidrata, masti i bjelančevina kod dijabetesa nedostatno je djelovanje inzulina na ciljana tkiva. Nedostatno djelovanje inzulina rezultat je neadekvatnog lučenja inzulina i/ili smanjenog odgovora tkiva na inzulin u jednoj ili više točaka u složenim putovima hormonskog djelovanja. Oštećenje procesa izlučivanja inzulina i nedostaci u djelovanju inzulina često koegzistiraju kod istog pacijenta i često je nejasno koji je poremećaj, ako i je jedan od njih, primarni uzrok hiperglikemije [1].

Simptomi izrazite hiperglikemije uključuju poliuriju, polidipsiju, gubitak težine, ponekad s polifagijom i zamagljen vid. Poremećaj rasta i osjetljivost na određene infekcije također mogu pratiti kroničnu hiperglikemiju. Akutne, po život opasne posljedice nekontroliranog dijabetesa su hiperglikemija s ketoacidozom ili neketotični hiperosmolarni sindrom [1].

Većina slučajeva dijabetesa ubraja se u dvije etiopatogenetske kategorije. U jednoj kategoriji, dijabetesu tipa 1, uzrokovan je apsolutnim nedostatkom lučenja inzulina. Pojedinci s povećanim rizikom od razvoja ove vrste dijabetesa često se mogu identificirati serološkim dokazima autoimunog patološkog procesa koji se događa na Langerhansovim otočićima gušterače i genetskim markerima. U drugoj, puno češćoj i raširenijoj kategoriji, dijabetesu tipa 2, uzrok je kombinacija rezistencije na djelovanje inzulina i neadekvatan kompenzacijski sekretorni odgovor inzulina [1].

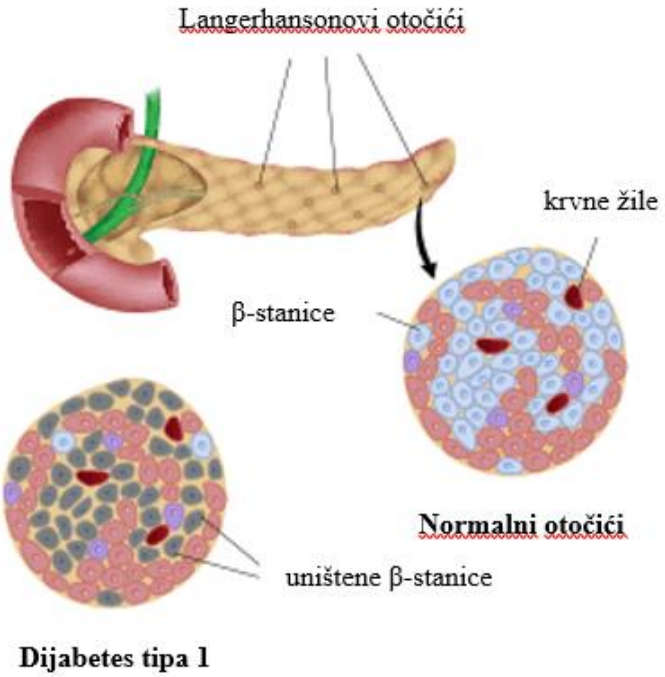
U drugoj kategoriji, stupanj hiperglikemije je dovoljan da uzrokuje patološke i funkcionalne promjene u različitim ciljnim tkivima, ali bez kliničkih simptoma, pa može biti prisutan dulje vrijeme prije otkrivanja dijabetesa. Tijekom ovog asimptomatskog razdoblja moguće je dokazati abnormalnost u metabolizmu ugljikohidrata mjerenjem glukoze iz

plazme natašte ili nakon oralnog testa opterećenja glukozom. Stupanj hiperglikemije (ako ona postoji) može se s vremenom mijenjati, ovisno o opsegu osnovnog procesa bolesti. Proces bolesti može biti prisutan, ali možda nije toliko napredovao da bi mogao izazvati hiperglikemiju. Isti proces bolesti može prouzročiti smanjenje glukoze natašte (eng. *impaired fasting glucose*, IFG) i/ili smanjenu toleranciju na glukozu (eng. *impaired glucose tolerance*, IGT) bez ispunjavanja kriterija za dijagnozu dijabetesa [1].

Kod nekih osoba s dijabetesom, odgovarajuća kontrola glikemije može se postići smanjenjem tjelesne težine, vježbanjem i/ili oralnim sredstvima za smanjenje glukoze. Stoga ove osobe ne trebaju inzulin. Ostale osobe koje imaju nešto rezidualnog lučenja inzulina, ali im je potreban egzogeni inzulin za odgovarajuću kontrolu glikemije, mogu preživjeti bez njega. Pojedinci s velikim udjelom uništenih β-stanica i zbog toga bez rezidualnog lučenja inzulina trebaju unositi inzulin za preživljavanje. Ozbiljnost metaboličkog poremećaja može napredovati, nazadovati ili ostati ista. Dakle, stupanj hiperglikemije odražava ozbiljnost osnovnog metaboličkog procesa i njegovog liječenja više nego prirodu samog procesa [1].

2.1.1. Dijabetes tipa 1

Imunološki posredovani dijabetes. Ovaj oblik dijabetesa obuhvaća samo 5–10% oboljelih od dijabetesa. Naziva ga se još i terminima dijabetes ovisan o inzulinu, dijabetes tipa I ili maloljetni dijabetes, a proizlazi iz stanično posredovanog autoimunog uništavanja β-stanica gušterača prikazanih na slici 1.



Slika 1. Normalni Langerhansonovi otočići gušterače i Langerhansonovi otočići gušterače kada je prisutan dijabetes tipa 1[5].

Markeri imunološkog uništavanja β-stanice uključuju autoantitijela stanica otočića, autoantitijela na inzulin, autoantitijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (GAD65) i autoantitijela na tirozin fosfataze IA-2 i IA-2β. Jedno ili obično više tih autoantitijela prisutno je u 85–90% osoba kada se u početku otkrije hiperglikemija natašte [1].

U ovom obliku dijabetesa, stopa uništavanja β-stanica prilično je promjenljiva, kod nekih osoba je brza (uglavnom kod novorođenčadi i djece), a kod drugih spora (uglavnom kod odraslih). Kod nekih pacijenata, osobito djece i adolescenata, može se pojaviti ketoacidoza kao prva manifestacija bolesti. Drugi imaju umjerenu hiperglikemiju natašte koja se može brzo promijeniti u tešku hiperglikemiju i/ili ketoacidozu u prisutnosti infekcije ili drugog stresa. Treći, osobito odrasli, mogu zadržati preostalu funkciju β-stanica dovoljno da spriječe ketoacidozu dugi niz godina. Takve osobe na kraju postaju ovisne o inzulinu kako bi preživjele i imaju rizik od ketoacidoze. U ovom kasnijem stadiju bolesti inzulin se izlučuje malo ili niti malo, što se očituje niskom razinom C-peptida u plazmi ili razinom koja je ispod razine detekcije. Imunološki posredovani dijabetes obično se javlja u djetinjstvu i adolescenciji, ali može se javiti u bilo kojoj dobi, čak i u osmom i devetom desetljeću života [1].

Idiopatski dijabetes. Neki oblici dijabetesa tipa 1 nemaju poznatu etiologiju. Neki od tih bolesnika imaju trajnu insulinopeniju i skloni su ketoacidozi, ali kod njih nema dokaza o autoimunosti. Iako se samo manjina bolesnika s dijabetesom tipa 1 ubraja u ovu kategoriju, od onih koji se ubrajaju, većina je porijeklom iz Afrike ili Azije. Pojedinci s ovim oblikom dijabetesa pate od epizodne ketoacidoze i pokazuju različite stupnjeve nedostatka inzulina između epizoda. Ovaj oblik dijabetesa snažno je naslijediv i nema imunoloških dokaza za autoimunost β-stanica. Apsolutni zahtjev za nadomjesnom terapijom inzulinom kod oboljelih pacijenata može doći i proći [1].

2.1.2. Dijabetes tipa 2

Ovaj oblik dijabetesa, na koji otpada ~ 90–95% oboljelih od dijabetesa, obuhvaća osobe koje imaju inzulinsku rezistenciju i obično imaju relativni (ne apsolutni) nedostatak inzulina. Naziva se još dijabetesom koji nije ovisan o inzulinu, dijabetesom tipa II ili dijabetesom kod odraslih. Barem u početku bolesti, a često i tijekom cijelog svog života, tim osobama nije potreban inzulinski tretman za preživljavanje. Vjerojatno postoji mnogo različitih uzroka ovog oblika dijabetesa. Iako specifične etiologije nisu poznate, ne dolazi do autoimunog uništavanja β-stanica [1].

Većina bolesnika s ovim je oblikom dijabetesa pretilo, a sama pretilost uzrokuje određeni stupanj inzulinske rezistencije. Pacijenti koji nisu pretili prema tradicionalnim kriterijima težine mogu imati povećani postotak tjelesne masti raspodijeljene pretežno u trbušnoj regiji. Ketoacidoza se rijetko javlja spontano kod ove vrste dijabetesa. Kada se pojavi, obično nastaje zbog neke druge bolesti poput infekcije. Ovaj oblik dijabetesa često se ne dijagnosticira dugi niz godina jer se hiperglikemija razvija postupno, a u ranijim fazama često nije dovoljno ozbiljna kako bi pacijent mogao primijetiti bilo koji od klasičnih simptoma dijabetesa. Ipak, takvi pacijenti imaju povećani rizik od razvoja makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija. Dok pacijenti s ovim oblikom dijabetesa mogu imati razinu inzulina koja se čini normalnom ili povišenom, očekivalo bi se da će veća razina glukoze u krvi kod ovih dijabetičara rezultirati još višim vrijednostima inzulina da je funkcija njihovih β-stanica bila normalna. Stoga je izlučivanje inzulina kod ovih bolesnika neispravno i nedovoljno za kompenzaciju inzulinske rezistencije. Inzulinska rezistencija može se poboljšati smanjenjem tjelesne težine i/ili farmakološkim liječenjem hiperglikemije, ali se rijetko vraća u normalu. Rizik od razvoja ovog oblika dijabetesa povećava se s godinama, pretilošću i nedostatkom tjelesne aktivnosti. Češće se javlja kod žena s

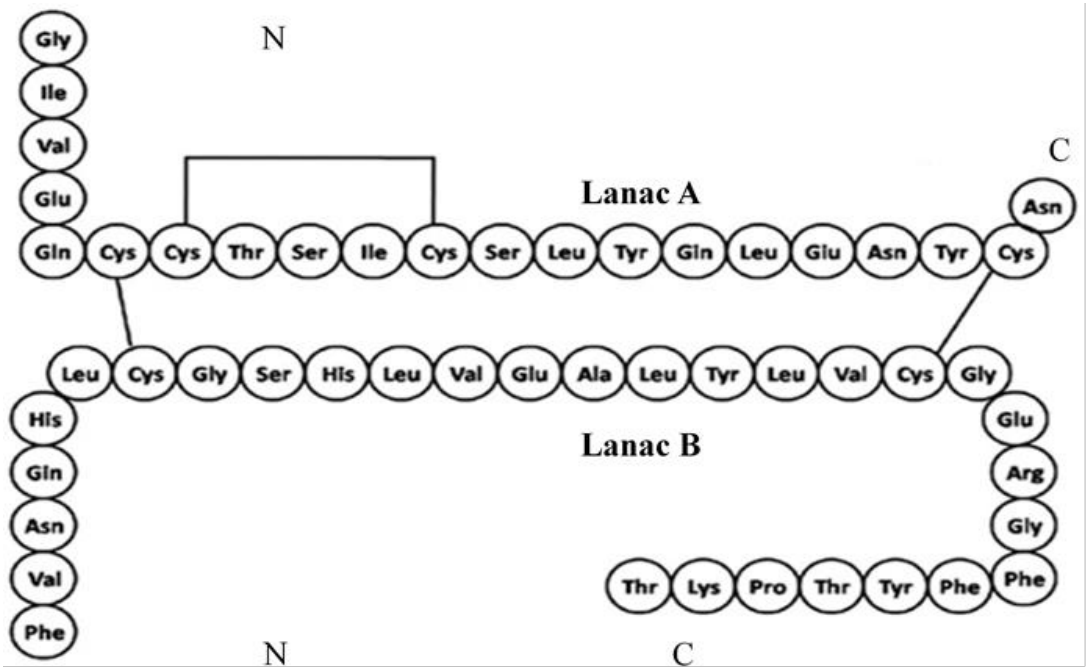
prethodnim gestacijskim dijabetesom (GDM, trudnički dijabetes) i kod osoba s hipertenzijom ili dislipidemijom, a njegova učestalost se razlikuje u različitim rasnim/etničkim podskupinama. Često je povezan s jakom genetskom predispozicijom, više nego autoimuni oblik dijabetesa tipa 1. Međutim, genetika ovog oblika dijabetesa složena je i nije jasno definirana [1].

2.1.3. Drugi tipovi dijabetesa

Osim glavna dva tipa dijabetesa, poznato je još nekoliko koji su puno rjeđi. To su: genetske greške β-stanične funkcije (MODY); genetske greške inzulinske akcije; bolesti egzokrine gušterače (pankreatitis, trauma ili operacija gušterače, tumor gušterače, hemokromatoza, cistična fibroza i dr.); endokrinopatije (akromegalija, Cushingov sindrom, glukagonom, feokromacitom, hipertireoza, somatostatinom, aldosteronom i dr.); lijekovi i kemikalije (glukokortikoidi, tiazidni diuretici, hormoni štitnjače, beta-agonisti, nikotinska kiselina, gama interferon, diazoksid i dr.); infekcije (kongenitalna rubeola, citomegalovirus i dr.); rijetki oblici – dijabetes posredovan imunošću (antitijela protiv inzulinskih receptora i dr.); drugi genetski sindromi povezani s dijabetesom (Downov sindrom, Prader Willi sindrom, Turnerov sindrom, Klinefelterov sindrom i dr.); gestacijski (trudnički) dijabetes [6].

2.2. Inzulin i njegova svojstva

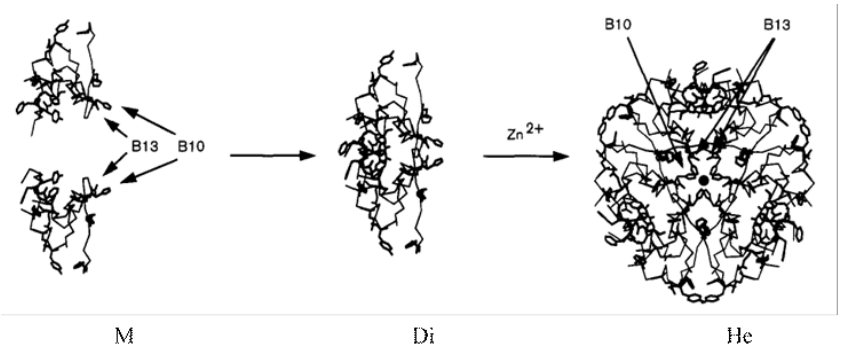
Inzulin je dipeptid koji se sastoji od 51 aminokiseline s molekularnom masom 5802 g/mol. Njegova dva lanca nazvana su A i B. Lanac A sastoji se od 21 aminokiseline, a B lanac od 30 aminokiselina te je primarna struktura prikazana na slici 2. [2].



Slika 2. Primarna struktura ljudskog inzulina [7].

Lanci A i B spojeni su disulfidnim mostovima jer oba lanca sadrže cisteine. Lanac A također ima jedan unutarnji disulfidni most. Sva tri disulfidna mosta doprinose inzulinskoj aktivnosti održavajući biološki aktivnu konformaciju. Poznato je kako je spiralna struktura A12-18 esencijalna za biološku aktivnost inzulina [7].

Iako inzulin u serumu cirkulira i veže se za receptor u monomernom obliku, on formira dimere u mikromolarnim koncentracijama, a u prisutnosti cinkovih iona, dalje se slaže u heksamere te je taj proces prikazan na slici 3. [2].



Slika 3. Postupak sklapanja monomera, dimera i heksamera inzulina. Prikazani su samo kostur i odabrani ostaci. B10 histidin koordinira dva centralna cinkova iona. Šest B13 glutamatnih ostataka je skriveno u heksameru u međusobnoj udaljenosti veličine vodikovih veza [2].

Izoelektrična točka inzulina je oko 5,4. Pri toj pH vrijednosti se ne može pripremiti otopina inzulina zbog njegove agregacije. Stoga su za mjerenje zeta potencijala Zhang i suradnici [7] u svome radu odabrali dvije različite pH vrijednosti. Odabrane su pH 3,3 (niža od izoelektrične točke) i pH 7,4 (viša od izoelektrične točke). Izmjerene vrijednosti zeta potencijala inzulina pri ta dva pH su oko 33 mV za pH 3,3 i oko -65 mV za pH 7,4 [7].

2.2.1. Terapijska upotreba inzulina i njegove alternative

Zbog iznimne degradacije inzulina proteazama u gastrointestinalnom traktu kada se unese u tijelo oralno, inzulin se trenutno može davati pacijentu jedino parenteralno. Prema tome, injekcija ili infuzija u potkožno tkivo jedini je prihvaćeni oblik terapijske upotrebe inzulina u kliničkoj praksi [3]. No, takva primjena je bolna, a i rukovanje sa špricama je bilo zamorno. Daljnje mane potkožnih injekcija inzulina uključuju nefiziološka mjesta unosa (što u konačnici rezultira visokim koncentracijama inzulina u perifernoj krvi u odnosu na one koncentracije koje su postignute u portalnoj veni), lokalnu degradaciju inzulina u potkožnom skladištu (npr. biodostupnost <100%), veliku varijabilnost u adsorpciji i relativno sporu adsorpciju iz potkožnog tkiva [3]. Zbog toga je došlo do razvoja modernih injekcijskih uređaja kao što su inzulinske olovke ili vrlo oštre igle što je uvelike smanjilo bol uboda injekcije i povećalo praktičnost. Iako se teret potkožne primjene inzulina smanjio i dalje je potrebno rukovanje uređajem (često u javnosti) te je i dalje povezano s boli, iako je gotovo zanemariva danas [3].

Alternativne rute unosa inzulina, koje su bile proučavane vrlo detaljno u zadnjih stotinjak godina, uključuju dermalne, oralne, nazalne i pulmonalne rute unosa inzulina [3].

2.2.1.1. Dermalna dostava inzulina

Ljudska koža je vrlo učinkovita barijera koja ima ulogu zaštite od vanjskog okoliša. No, već kod prvih eksperimenata dermalne dostave inzulina bilo je dokaza kako određeni dio inzulina dolazi do krvi. Jedan od pokušaja poboljšanja biodostupnosti bio je primijeniti električni potencijal preko kože. U ovisnosti o ukupnom naboju molekula inzulina, primijenjeni potencijal je doveo do povišenja transfera inzulina kroz kožu kod miševa bez dlaka. No, i s ovim vrlo složenim načinom transfera, jako je mala količina primijenjenog inzulina uistinu prenesena. Jedan od pristupa transfera inzulina bila je iontoforeza. Količina

prenesenog inzulina može se mijenjati promjenom snage primijenjenog električnog polja. Drugi pokušaji povećanja udjela prenesenog inzulina koristili su kemijske tvari ili ultrazvučne tehnike za oslabljenje kožne barijere [3].

Inovativni pristup povećanja prijenosa tvari kroz kožu koristi tehnologiju Transferosoma® [3, 8]. Transferosomi su čestice slične liposomima, no imaju veću fleksibilnost i stabilnost što im pruža prodiranje kroz ljudsku kožu. Inkorporacija molekula inzulina u transferuline rezultira prijenosom značajne količine inzulina kroz kožu u krv kod miševa i manji dio kod ljudi. Preliminarna klinička testiranja s ovim pristupom su ipak pokazala kako se efikasnost i reproducibilnost prijenosa inzulina mora dalje poboljšati [3].

2.2.1.2. Oralna dostava inzulina

Ubrzo nakon otkrića inzulina, znanstvenici su pokušali naći način kako izbjeći inaktivaciju inzulinskog peptida u gastrointestinalnom traktu i kako postići dovoljno dobru apsorpciju inzulina u crijevima oblaganjem inzulina u kapsule ili slojeve lipida. Velika prednost ove rute dostave inzulina je što bi inzulin, kada se apsorbira iz crijeva, bio direktno dostavljen u jetru gdje bi imao direktan utjecaj na proizvodnju glukoze u jetri, slično fiziološkom stanju [3]. Također, mnogim pacijentima je, uzimanje inzulina u obliku tablete vrlo privlačno.

Glavni problem s oralnom dostavom inzulina, osim proteolize u želucu i tankom crijevu, je taj da ne postoje selektivni transportni mehanizmi za inzulin kroz stjenku želuca. Epitelne stanice intestinalnog trakta inače ne prenose makromolekule. Stoga, čak i ako se inzulin unese direktno u želudac, potrebne su iznimno velike doze kako bi se postigla barem neka mjerljiva apsorpcija inzulina. Još jedan problem je nepredvidivo vrijeme prijenosa u želucu i također zakašnjela apsorpcija inzulina iz kapsule [3].

Nedavno je kanadska tvrtka (Generex, Toronto) razvila novi pristup koji je stekao izvjesno zanimanje. Tekuća formulacija inzulina poprska se jednostavnim inhalatorom za doziranje u usta kao fina maglica. Brza lokalna apsorpcija 100 IU tog inzulina kroz mukoznu sluznicu i u regije srednjeg dijela ždrijela dovela je do pada glukoze iz krvi za 20 mg/dL, povećanja u serumskom inzulinu za 8 mU/L i supresije C-peptida iz seruma u zdravim ispitanicima. Prethodna istraživanja s ovim pristupom kod životinja nisu uspjela prikazati dovoljan prijenos inzulina kroz usnu sluznicu. Stoga je potrebno prikupiti još puno kliničkih i toksikoloških podataka prije nego se donese konačan i ispravan zaključak o ovom načinu pristupa [3].

2.2.1.3. Nazalna dostava inzulina

Sprejanje tekućine koja sadrži inzulin u nos dovodi do brze apsorpcije inzulina kroz nazalnu sluznicu (s apsorpcijskom površinom približno 160 cm^2). Farmakokinetički profil je karakteriziran brzim povećanjem i smanjenjem koncentracija serumskog inzulina. Promatrane promjene u perifernim koncentracijama serumskog inzulina su slične fiziološkim situacijama [3].

Farmakodinamička istraživanja inzulina koji je primijenjen kroz nos pokazuju kako se u zdravim pojedincima početak djelovanja dogodio unutar 10 minuta nakon unosa. Vrhunac učinka snižavanja glukoze ovisan o dozi postignut je nakon 20-45 minuta i to se nastavilo preko perioda od 90-120 minuta. Ovaj način se čini povoljniji za nadomjestak inzulina prije jela u odnosu na način djelovanja inzulina koji je dan potkožno. To čini nazalnu dostavu inzulina vrlo privlačnim načinom primjene [3]. Stoga su, kako je i očekivano, rezultati nazalne primjene inzulina kod pacijenata s dijabetesom tipa 1, pod eksperimentalnim uvjetima, prikazali veće smanjenje glukoze nakon obroka nego unosom potkožno. No, obrada podataka nije potvrdila te početne pozitivne rezultate [3]. U dugoročnim istraživanjima s pacijentima koji boluju od dijabetesa tipa 1 nije se moglo postići stalno poboljšanje metaboličke kontrole nazalnom primjenom [3].

Za pacijente s dijabetesom tipa 2, znanstvenici su se nadali kako će nazalna primjena inzulina biti jednostavan i lak način za nadomjestak potreba za inzulinom prije obroka, no u kliničkim istraživanjima nisu postignuti željeni rezultati. Ovi su neočekivani negativni rezultati pripisani kratkom metaboličkom učinku nazalno primijenjenog inzulina. To je dovelo do daljnjih istraživanja s pacijentima s dijabetesom tipa 2 u kojima su dvije ili čak tri visoke doze (60 ili 120 U) dane nazalno za samo jedan obrok. Samo s ovom nepraktičnom učestalošću davanja nazalnog inzulina mogla se postići dobra kontrola glukoze nakon obroka [3].

Biodostupnost nazalne dostave inzulina bila je <10%, vrijednost koja se mogla postići samo uz pomoć „pojačivača apsorpcije“. Takvi agensi povećavaju brzinu apsorpcije, relativno velikih peptida kao što je inzulin, kroz epitelnu barijeru. No samo nekoliko od velikog broja proučavanih agenasa povećalo je brzinu apsorpcije bez iritiranja nazalne sluznice ili bez negativnih nuspojava.

Još jedan problem nazalnog načina dostave inzulina je značajna intra- i interindividualna varijabilnost u biodostupnosti. Mogući razlog navedenih razlika je

nejednolika proizvodnja sluzi nazalne sluznice. Uz taj gubitak inzulina, anatomske strukture nosa ograničavaju volumen aerosola koji se može uspješno distribuirati.

Ti pronalasci objašnjavaju zašto nije uočen nikakav napredak metaboličke kontrole prije jela nazalnom dostavom inzulina u odnosu na inzulin dostavljen potkožnom injekcijom. Kako ova ruta dostave ne predstavlja realističnu alternativu za dostavu inzulina potkožno, razvoj nazalne dostave inzulina za kliničke potrebe je otkazan [3].

2.2.1.4.Pulmonalna dostava inzulina

Visoka razina inzulina u plućima bi teoretski omogućila početak klinički povoljnog metaboličkog učinka. No, sposobnost funkcioniranja u biološkom sustavu koja je bila uočena u kliničkim testiranjima s inhalatorima koji nisu optimizirani za inhalaciju inzulina, bila je nedovoljna u većini slučajeva. Bilo je potrebno osmisliti nove, moderne, manje inhalatore za praktičnu terapiju. Profil odnosa vremena i djelovanja promatran nakon inhalacije inzulina s tim poboljšanim inhalatorima bili su, u većini slučajeva, dobri barem kao oni zabilježeni nakon potkožne dostave običnog inzulina. U naknadnim istraživanjima povezanima s obrocima, metabolička kontrola nakon obroka bila je jednako dobra kao s potkožnim redovnim inzulinom. U kliničkim testiranjima izvedenim s modernim inhalatorima, dostava inzulina u pluća dovela je do sveukupne metaboličke kontrole koja se može usporediti s onom zabilježenom s konvencionalnom inzulinskom terapijom. Veliki problem s pulmonalnim načinom dostave inzulina je gubitak do 90% inzulina, što ovu terapiju može činiti potencijalno skupom [3]. Do sada je razvijeno nekoliko sustava za dostavu inzulina inhalacijom, no veliki dio istraživanja u ovom području je zaustavljen ili odgođen. Pfizer-ova Exubera bila je prvi inhalacijski inzulin koji je primio odobrenje od Agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and drug administration,* FDA) 2006. godine. No, iako je Exubera pokazala kliničku učinkovitost u glikemičkoj kontroli i nizak rizik od hipoglikemije, povučen je s tržišta zbog slabog prihvaćanja od strane pacijenata i liječnika koji je propisuju [9].

2.3. Hidrogelovi

Hidrogelove čine polimerne mreže koje sadrže veliki broj hidrofilnih skupina ili domena. Te mreže imaju visoki afinitet za vodu ali se u njoj ne otapaju zbog kemijskih odnosno fizikalnih veza koje su formirane između polimernih lanaca. Voda prodire u te

mreže uzrokujući bubrenje i dajući hidrogelu oblik [10, 11]. Količina vode koju hidrogel može pohraniti unutar svojih pora mijenja se ovisno o kemijskom sastavu hidrogela, od 30 % do više od 99 % ukupne mase [12]. Potpuno nabubreni hidrogelovi posjeduju neka fizikalna svojstva slična svojstvima živih tkiva, a ona uključuju teksturu poput gume i malu međupovršinsku napetost s vodom i biološkim tekućinama. Otkriveno je kako elastična priroda potpuno nabubrenih ili hidratiranih hidrogelova minimizira iritaciju okolnih tkiva nakon implantacije. Mala međupovršinska napetost između površine hidrogela i tjelesnih tekućina minimizira adsorpciju proteina i prianjanje stanica, što reducira vjerojatnost negativne imunosne reakcije [11]. Zbog karakterističnih svojstava hidrogelovi zadovoljavaju materijalne i biološke zahtjeve za liječenje ili zamjenu tkiva i organa ili funkciju živih tkiva, kao i za interakciju s biološkim sustavom [13]. Također, hidrogelovi imaju nekoliko dodatnih osobina koja ih čine izvrsnima za dostavu lijekova. Dimenzije hidrogelova mogu jako varirati, od nekoliko nanometara do nekoliko centimetara u širinu. Lako se prilagođavaju obliku bilo kojeg prostora u kojem se nalaze. Zbog fiziokemije hidrogela koja je slična prirodnoj izvanstaničnoj sredini, kompozitno i mehanički, hidrogelovi mogu imati dvojnu ulogu ponašajući se kao potporni materijal za stanice tijekom regeneracije tkiva kao i za dostavu lijeka [11].

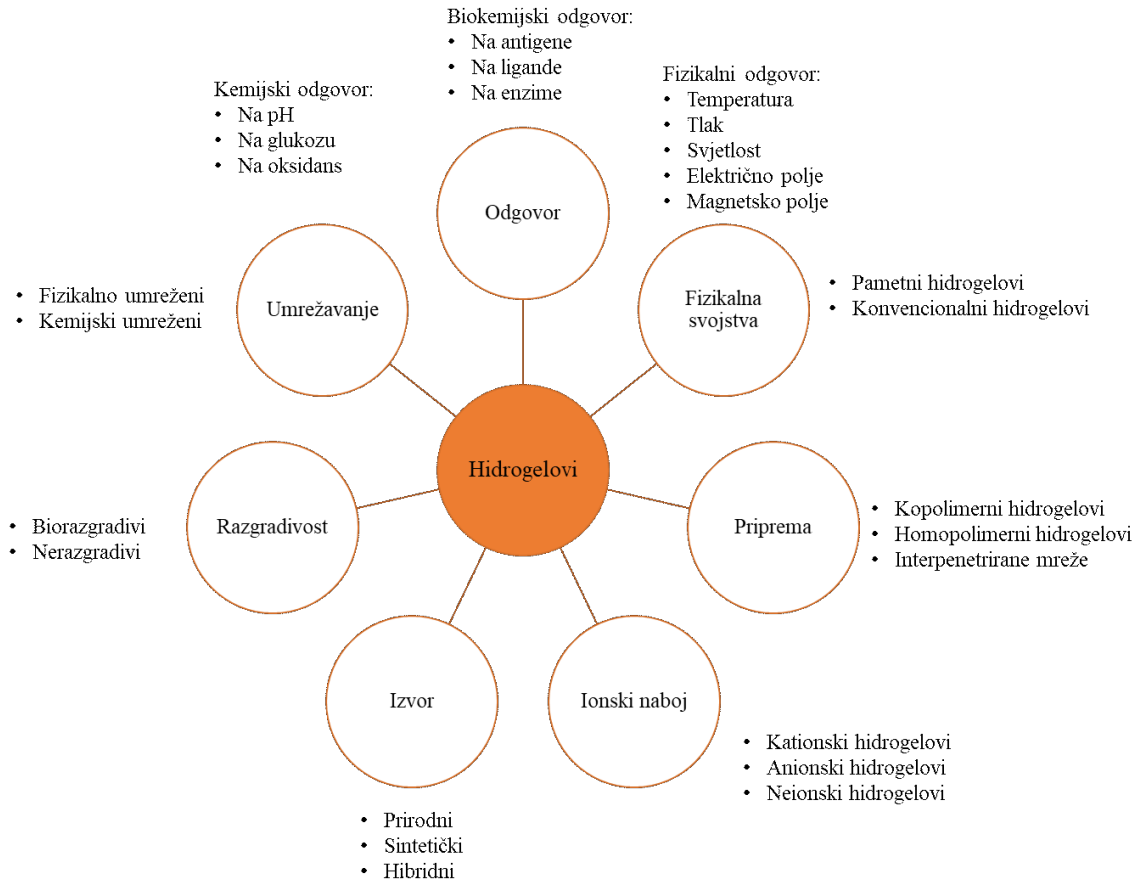
Umrežavanje hidrogelova može se dogoditi u dva okoliša: *in vitro*, tijekom pripreme hidrogela ili *in vivo* (*in-situ*), nakon aplikacije na točnu lokaciju u ljudskom tijelu [14]. Za inicijaciju kemijskog umrežavanja potrebno je uvesti agens za umrežavanje niske molekulske mase zajedno s polimerom u reakcijsku smjesu. Ako nema točaka umrežavanja, hidrofilni linearni polimerni lanci otapaju se u vodi jer su polimerni lanac i voda termodinamički kompatibilni. Ipak, u njihovoj prisutnosti, topljivost je uravnotežena povratnom silom elastičnosti točki umrežavanja u mreži. Kada se te sile izjednače, nabubreni hidrogel dosegne ravnotežu. Mreža polimera je hidrofilna zbog kapilarnog efekta, osmotskog tlaka i prisutnosti hidrofilnih skupina kao što su -NH_2, -COOH, -OH, $CONH_2$, -CONH i -SO_3H [13]. Kemijske i fizikalne točke umrežavanja održavaju 3D strukturu hidrogelova u nabubrenom stanju. U kemijskom umrežavanju, polimerni lanci su kovalentno vezani preko agensa za umrežavanje, dok u fizikalnom umrežavanju hidrogelovi posjeduju spojeve fizikalnih domena, vodikove veze, hidrofobne interakcije, ionske komplekse koji omogućuju lijevanje uz otapala, modifikaciju ostatka nakon procesa, jednostavnost izrade, preoblikovanje, biorazgradnju i netoksičnost čime pokazuju bolja svojstva, koja kemijski umreženim hidrogelovima nedostaju [13]. Potrebni su različiti znanstveni pristupi za dizajniranje i obradu hidrogela za određenu primjenu kako bi se pokazala najveća mehanička

snaga, kemijska svojstva, odgovor na stimulanse, gustoća, biodegradacija, te biološki i okolišni odgovor. Polimerizacija otopine i polimerizacija suspenzije najčešće su metode za stvaranje različitih hidrogelnih mreža kojima se kontrolira strukturom tako što se kontrolira gustoća umrežavanje, inicijator, emulgator i reakcijski uvjeti te krojena svojstva poput kemijskog, fizikalnog i biološkog odgovora na stimulans, mehaničku snagu, biodegradaciju i topljivost [13].

Voda apsorbirana u nabubreni hidrogel u ravnoteži naziva se slobodna voda i popunjava prostore između mreže ili lanaca i središta većih pora. Količina vode koju će apsorbirati hidrogel ovisi o temperaturi i specifičnim interakcijama između molekula vode i polimernih lanaca [13, 14].

2.3.1. Klasifikacija hidrogelova

Klasifikacija hidrogelova ovisi o njihovim fizikalnim svojstvima, prirodi bubrenja, metodi pripreme, podrijetlu, ionskim nabojima, izvoru, brzini biodegradacije i promatranoj prirodi umrežavanja, a prikazana je na slici 4. [13, 15].



Slika 4. Klasifikacija hidrogelova temeljena na različitim svojstvima [13].

2.3.1.1. Umrežavanje u hidrogelovima

Jednom kada su različiti polimeri uvedeni, nastale mreže pokazuju viskoelastično i ponekad potpuno elastično ponašanje. Kako bi se opisalo umrežavanje u hidrogelovima, objašnjeni su različiti znanstveni pristupi.

U fizikalnim gelovima priroda procesa umrežavanja obično se postiže fizikalnim postupcima kao što su hidrofobna asocijacija, agregacija lanaca, kristalizacija, kompleksiranje polimernih lanaca i vodikovim vezama. S druge strane, kemijski postupak, npr., kemijsko kovalentno umrežavanje (simultano ili nakon polimerizacije) korišteno je za pripremu kemijskog hidrogela. Fizikalni hidrogelovi reverzibilni su zbog konformacijskih promjena, dok su kemijski hidrogelovi trajni i nepovratni zbog konfiguracijskih promjena. Još jedna kategorija je hidrogel s dvostrukom mrežom koji se formira kombinacijom fizikalno i kemijski umreženih hidrogelova zbog elektrostatskih interakcija. Korišten je za prevladavanje nedostataka koje imaju samo fizikalni ili samo kemijski hidrogelovi s visokim kapacitetom apsorpcije tekućine u širokom rasponu pH vrijednosti i većom osjetljivošću na promjene pH u usporedbi s kemijskim hidrogelovima. Nedavno je napravljen još jedan hidrogel s dvostrukom mrežom koji se sastoji od grafen-polimernih kompozita s vrhunskim mehaničkim svojstvima i sposobnošću samozacjeljenja [13, 16].

Posljednjih godina raste interes za fizikalno umrežene gelove. Glavni je razlog za to izbjegavanje korištenja agensa za umrežavanje pri pripremi takvih gelova. Ti agensi utječu, ne samo na cjelovitost supstanci koje su zarobljene (npr. proteini, stanice), nego su ti agensi često otrovni spojevi koje se mora ukloniti/ekstrahirati iz gelova prije primjene. Za kreiranje fizikalno umreženih gelova, istražene su druge metode kao što su umrežavanje radikalnom polimerizacijom, umrežavanje kemijskom reakcijom komplementarnih skupina, umrežavanje ionskim reakcijama, te umrežavanje kristalizacijom [13].

2.3.1.2. Hidrogelovi osjetljivi na vanjske podražaje

To su hidrogelovi koji odgovaraju na podražaje iz okoline i prolaze kroz neočekivane promjene u njihovom rastu, strukturi mreže, mehaničkoj čvrstoći i propusnosti. Naziva ih se još i pametnim hidrogelovima. Fizikalni podražaji uključuju svjetlost, tlak, temperaturu, električno polje, magnetsko polje, mehanički stres i jačinu različitih izvora energije koji

mijenjaju molekularne interakcije na bitnim mjestima. Kemijski podražaji uključuju pH, ionske faktore i kemijske agense koji mijenjaju interakcije između polimernih lanaca i otopina i između polimernih lanaca na molekularnoj razini [13].

2.3.1.3. Primjena hidrogelova

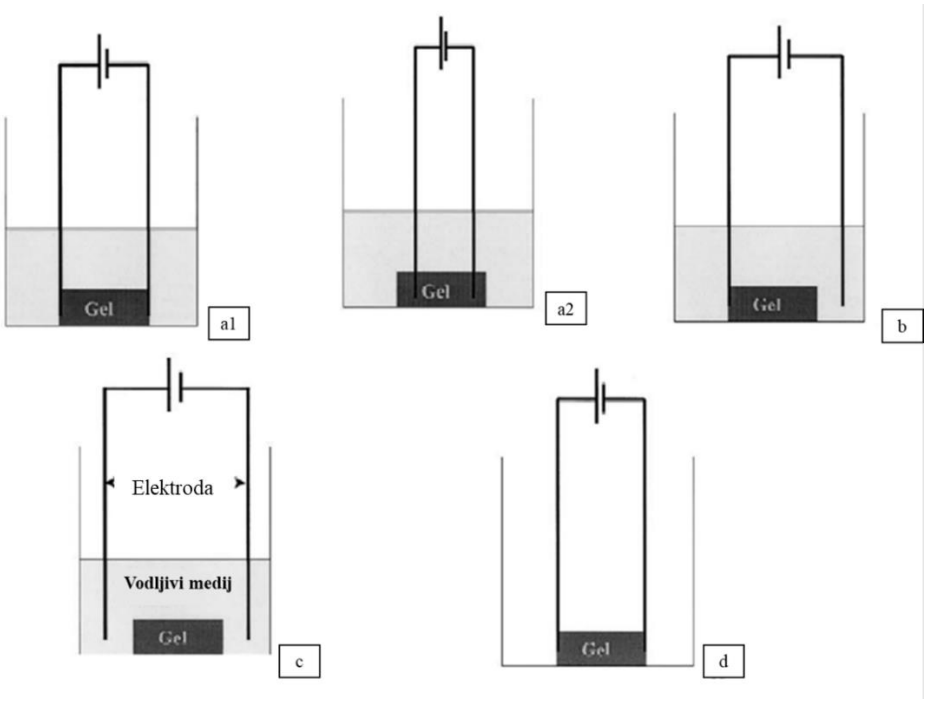
Hidrogelovi mogu biti pripravljeni od gotovo bilo kojeg polimera topljivog u vodi obuhvaćajući široki opseg kemijskih spojeva i veliki dio fizikalnih svojstava. Nadalje, hidrogelovi mogu biti formirani u mnoštvo oblika uključujući ploče, mikročestice, nanočestice, premaze i filmove [17]. Zbog toga su našli razne sjajne primjene u inženjerstvu, biologiji i farmaciji. Polielektrolitni hidrogelovi su posebno korisni zato što oni ili nose ili razvijaju naboje na lancu i vežu se sa suprotno nabijenim vrstama tvoreći komplekse zbog čega imaju brojne primjene u dostavi proteina peptida i hormona; u agrikulturi, hortikulturi, biotehnologiji; konstrukciji stanica; te u farmaciji i biomedicini [13].

Jedinstvena fizikalna svojstva hidrogelova pobudila su interes i za njihovim primjenama u dostavi lijekova. Visoko porozne strukture mogu vrlo lako biti prilagođene kontroliranjem gustoće umreženosti u gelu i sklonosti hidrogelova vodenim okruženjima u kojima su nabubreni. Njihova poroznost također dopušta punjenje lijekova u gel i naknadno otpuštanje lijeka brzinom koja je ovisna u difuzijskom koeficijentu male molekule ili makromolekule kroz mrežu gela. Prednosti hidrogelova za dostavu lijekova mogu biti uglavnom farmakokinetičke, posebno kada se stvara formulacija u kojoj se lijekovi polako eluiraju, održavajući visoku lokalnu koncentraciju lijeka u okolnom tkivu tijekom produljenog razdoblja, iako se mogu koristiti i za sustavnu dostavu [17].

2.3.2. Hidrogelovi i kompoziti hidrogelova za elektromodulacijsko otpuštanje lijekova

Električna struja također može biti korištena kao signal za izazivanje odgovora u hidrogelovima. Hidrogelovi koji su osjetljivi na tok električne struje obično su napravljeni od polielektrolita. Hidrogelovi podložni elektromodulaciji prolaze kroz sušenje i bubrenje kada se primijenjeni električno polje. Ponekad, hidrogelovi nabubre na jednoj strani, a na drugoj se osuše, što rezultira savijanjem hidrogelova. Promjena oblika hidrogela (uključujući bubrenje, sušenje i savijanje) ovisi o brojnim uvjetima [15, 18].

Pri istraživanju ovih hidrogelova, znanstvenici su koristili različite postave što je shematski prikazano na slici 5. [19].



Slika 5. (a)-(d) Primjeri različitih eksperimentalnih postava koje su bile korištene u istraživanju dostave lijekova pomoću hidrogelova osjetljivih na elektromodulaciju [19].

Ako je površina hidrogela u kontaktu s elektrodom, rezultat primjene električnog polja na hidrogel može biti drugačiji nego u sustavima gdje je hidrogel postavljen u vodu (ili smjesu aceton – voda) bez dodirivanja elektrode. Rezultat je također drugačiji ako vodena faza sadrži elektrolite [15].

Djelomično hidrolizirani poliakrilamidni hidrogelovi koji su u kontaktu i s anodnim i s katodnim elektrodama podliježu kolapsu volumena pri beskrajno maloj promjeni električnog potencijala kroz gel. Potrebno je napomenuti kako hidrogelovi ne sadrže soli. Kada je potencijal primijenjen, hidratirani H^+ ioni migriraju prema katodi rezultirajući gubitkom vode na anodnoj strani. U isto vrijeme elektrostatska privlačnost negativno nabijenih skupina akrilne kiseline prema anodnoj površini stvara jednoosni stres duž osi gela, većinom na strani anode. Ova dva simultana događaja dovode do sušenja hidrogela na anodnoj strani [15].

Kada je hidrogel, izrađen od kopolimera natrijeva akrilna kiselina – akrilamida, postavljen u vodenu otopinu (smjesa aceton – voda) pod električnim poljem bez dodirivanja elektroda, tip deformacije hidrogela ovisi o koncentraciji elektrolita. U odsutnosti elektrolita ili u prisutnosti vrlo malih koncentracija elektrolita, primjena električnog polja uzrokuje sušenje hidrogela. To se događa zbog migracije Na^+ iona na katodnu elektrodu što rezultira

promjenama u karboksilnim skupinama polimernih lanaca iz -COO^- Na^+ u -COOH. Međutim, u prisutnosti visokih koncentracija elektrolita u otopini, više Na^+ ulazi u hidrogel nego što ih migrira iz hidrogela na katodu. Bubrenje je tada više istaknuto na strani hidrogela koji je okrenut prema anodi i to rezultira savijanjem hidrogelova. Ako se doda kationski tenzid, kao što je n-dodecil piridinijev klorid, u vodenu otopinu, bubrenje se događa na katodnoj strani hidrogela. To se događa zbog pomaka pozitivno nabijenih molekula tenzida prema katodi kako bi se formirao kompleks s negativno nabijenim polimernim lancima na strani hidrogela koja je okrenuta anodi [15].

Kada se mikrosferne čestice hidrogela stave u vodu bez ikakvih soli, primjena električnog polja rezultira sušenjem hidrogelova zbog elektroosmoze (migracije vode) i elektroforeze (migracije nabijenih iona) iz hidrogela na katodu. Ovo se svojstvo koristi za moduliranu dostavu lijekova pomoću uključivanja i isključivanja električnog polja. Kao što je gore opisano, odgovor hidrogelova podložnih elektromodulaciji ovisi o eksperimentalnim uvjetima i zbog toga bilo kakva generalizacija ponašanja bubrenje/sušenje se ne može napraviti [15, 19].

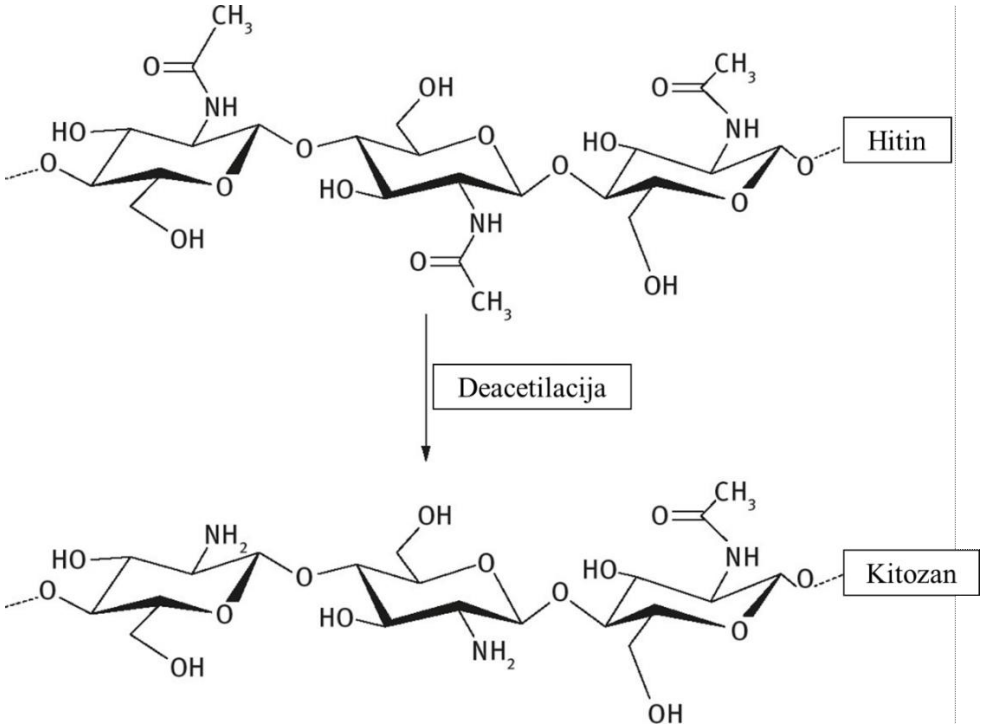
Nekoliko je primjera gdje se ovakvi hidrogelovi podložni elektromodulaciji koriste u kontroliranoj dostavi lijekova. Hidrogelovi izrađeni od poli(2-akrilamido-2-metilpropan sulfonska kiselina-ko-n-butilmetakrilata) uspjeli su pomoću električne struje pulsno otpustiti edrofonijev klorid i hidrokortizon. Kontrola otpuštanja i prestanka otpuštanja lijeka postignuta je variranjem intenziteta električne stimulacije u deioniziranoj vodi. Za edrofonij, koji je pozitivno nabijeni lijek, uzorak otpuštanja objašnjen je kao izmjena iona između pozitivno nabijene otopljene tvari i vodikovog iona koji je dobiven elektrolizom vode [15].

Kemomehaničko sušenje i bubrenje hidrogelova od poli (metakrilne kiseline) (eng. *poly(methacrylic acid)*, PMA) pod utjecajem električnog polja korišteno je za pulsnu dostavu pilokarpina i rafinoze. Mikročestice hidrogela poliakrilne kiseline (eng. *poly(acrylic acid,* PAA) koji je pokazao naglo sušenje s primjenom električne struje, vratile su se do svoje prvotne veličine kada je električno polje ugašeno. Promjene u veličini kod mikročestica uzrokovane električnim poljem rezultirale su profilima otpuštanja „uključeno-isključeno“ (eng. *„on-off“*). Promjene u volumenima kod poli(dimetilaminopropil akrilamidnih) hidrogelova koje su uzrokovane električnim poljem, u jednom su istraživanju korištene za pulsno otpuštanje inzulina [15, 19]. Monolitni uređaj koji se sastoji od natrijevog alginata i PAA je također korišten za pulsno otpuštanje hidrokortizona korištenjem električne stimulacije [15].

Uz bubrenje i kontrahiranje hidrogela, električno polje također je korišteno za kontrolu raspadanja hidrogelova napravljenih od poli(etil oksazolin)-PMA kompleksa u fiziološkoj otopini. Ta dva polimera tvore hidrogel pomoću vodikovih veza između karboksilnih i oksazolinskih skupina. Kada je gel pričvršćen za površinu katode, primjena električne struje uzrokuje raspad kompleksa u polimere topljive u vodi na površini gela okrenutog prema katodi. Erozija površine ovog polimernog sustava kontrolirana je ili kontinuiranim načinom ili korak po korak tako da se kontrolira primijenjena električna stimulacija. Pulsno otpuštanje inzulina postignuto je primjenom stupnjevane funkcije električne struje [15].

2.3.3. Kitozan

Kitozan se dobiva djelomičnom deacetilacijom netopljivog prirodno dostupnog hitina koji se dobiva iz egzoskeleta rakova, gljiva i insekata. Hitin ima krutu kristalnu strukturu zbog prisutnosti vodikovih veza između acetamidnih skupina i hidroksilnih skupina. Hitin se ne može lako aplicirati zbog visoke razine acetiliranih skupina i krute strukture, kao i zbog loše topljivosti u vodenim otopinama. Kada se hitin djelomično deacetilira i prevede u kitozan, kako je vidljivo na slici 6., povećana je količina amino skupina i njihova topljivost u vodi. Porast deacetilacije kitozana u odnosu na poboljšanje biokompatibilnosti i biorazgradivosti je proporcionalan [20].



Slika 6. Hitin je ekstrahiran iz ljuske rakova, te iz njega N-deacetilacijom nastaje kitozan [20].

Polisaharidna struktura kitozana sastoji se od glukozamina i N-acetilglukozamina. Glukozamin dolazi iz glukoze iz tijela i može tvoriti glikozaminoglikane (GAG) koji su dio izvanstanične tekućine i tkiva hrskavice [20].

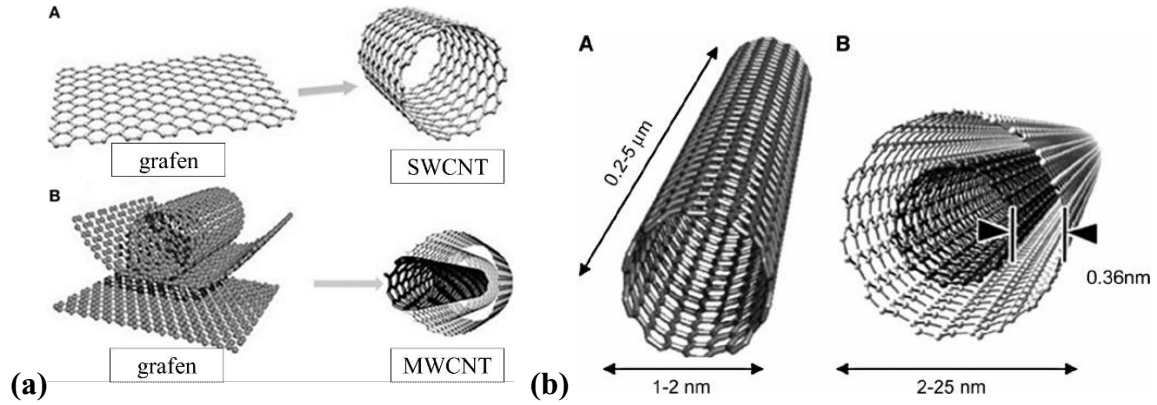
Gustoća naboja kitozana ovisi o stupnju deacetilacije koji predstavlja gustoću amino skupina. Vrijednost pH otopine kitozana predstavlja količinu ioniziranih amino skupina.

Kitozan je slaba baza, s pK_a vrijednosti od 6,5; koja može biti otopljena u kiselom mediju. Zbog prisutnosti amino i hidroksilnih skupina, molekule kitozana mogu tvoriti vodikove veze koje dovode do kristalne strukture polimera [20].

Kitozan se može naći s različitim molekulskim masama i stupnjevima acetilacije. Prosječna molekulska masa kitozana je između 50 i 2000 kD. Hidrofilni polimeri, kao što je kitozan, mogu se sustavno apsorbirati u ljudskom tijelu tako da polimeri trebaju imati prigodnu molekulsku masu kako bi se mogli eliminirati bubrežnom filtracijom. In vitro istraživanja pokazala su kako kitozan može biti razgrađen uz pomoć nekoliko enzima kao što su β-N-acetil heksoaminidaza, kitozinaza, hitinaza i hitin deacetilaza. U ljudskom tijelu kitozan se može biorazgraditi pomoću lizosoma, gastrointestinalnih enzima te bakterija iz debelog crijeva [20].

2.4. Ugljikove nanocijevi

Ugljikove nanocijevi (eng. *carbon nanotubes*, CNT) cilindrične su molekule koje se sastoje od smotanih listova grafena kako je prikazano na slici 7. Mogu biti jednostjenčane (eng. *single-walled carbon nanotubes,* SWCNT) promjera manjeg od 1 nm ili višestjenčane (eng. *multi-walled carbon nanotubes,* MWCNT), koje se sastoji od nekoliko međusobno povezanih nanocijevi, promjera koji može biti više od 100 nm. Njihova dužina može dosegnuti nekoliko mikrometara ili čak milimetara [21]. CNT su alotropi ugljika koji imaju nanostrukturu, a njihov omjer duljine i promjera može biti veći od 1,000,000 [22].



Slika 7. ***(a)*** *tipovi ugljikovih nanocijevi i* ***(b)*** *njihove dimenzije [23].*

Predstavljaju jedan od najvažnijih materijala u nanoznanosti i nanotehnologiji danas. Iznimna svojstva koja ti materijali posjeduju otvorila su nova polja u znanosti i inženjerstvu [23], a čine ih korisnima u području nanotehnologije i farmacije. One imaju vrlo širok raspon elektroničkih, toplinskih i strukturnih svojstava. Ova svojstva variraju ovisno o vrsti nanocijevi definiranoj njihovim promjerom, duljinom, kiralnošću ili načinom uvijanja i prirodom stijenki [24].

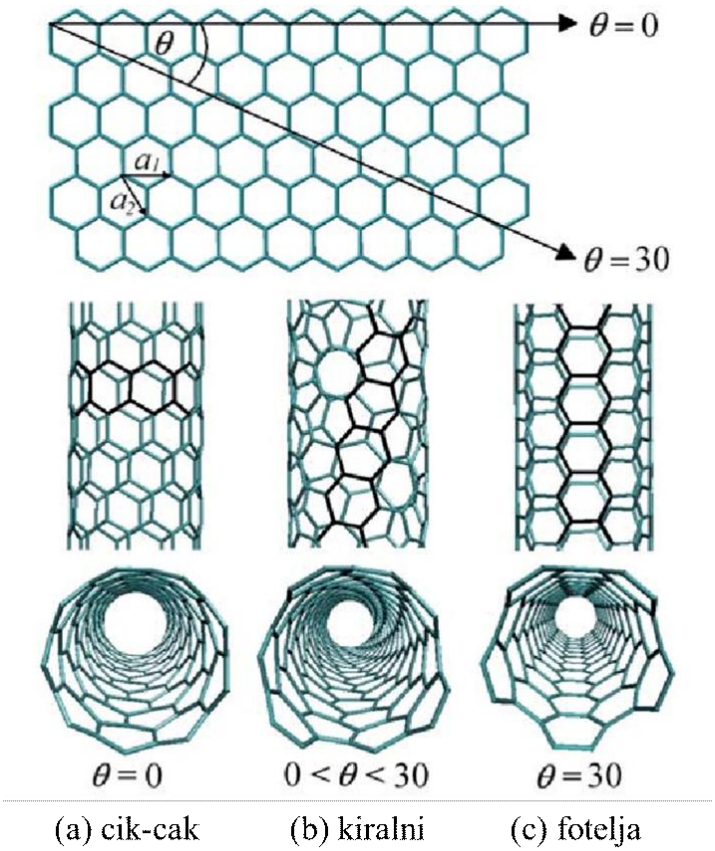
Vezivanje u ugljikovim nanocijevima je sp^2, pri čemu je svaki atom ugljika spojen s tri susjedna ugljika. Ova vezana struktura, koja je jača od veza sp^3 koje se nalaze u dijamantu, daje molekulama njihovu jedinstvenu snagu. Pod visokim tlakom, nanocijevi se mogu spojiti, mijenjajući neke sp^2 veze za sp^3 veze, stvarajući mogućnost proizvodnje snažnih žica neograničene duljine visokotlačnim spajanjem nanocijevi [24].

Danas se MWNT i SWNT proizvode uglavnom lučnim pražnjenjem, laserskom ablacijom, plinsko-faznim katalitičkim rastom iz ugljikovog monoksida i kemijskim taloženjem para (CVD) iz ugljikovodika. Sintetizirani uzorci nanocjevčica karakterizirani su

Ramanovom, elektroničkom i optičkom spektroskopijom. Važne informacije dobivaju se mehaničkim, električnim i toplinskim mjerenjima [22, 24].

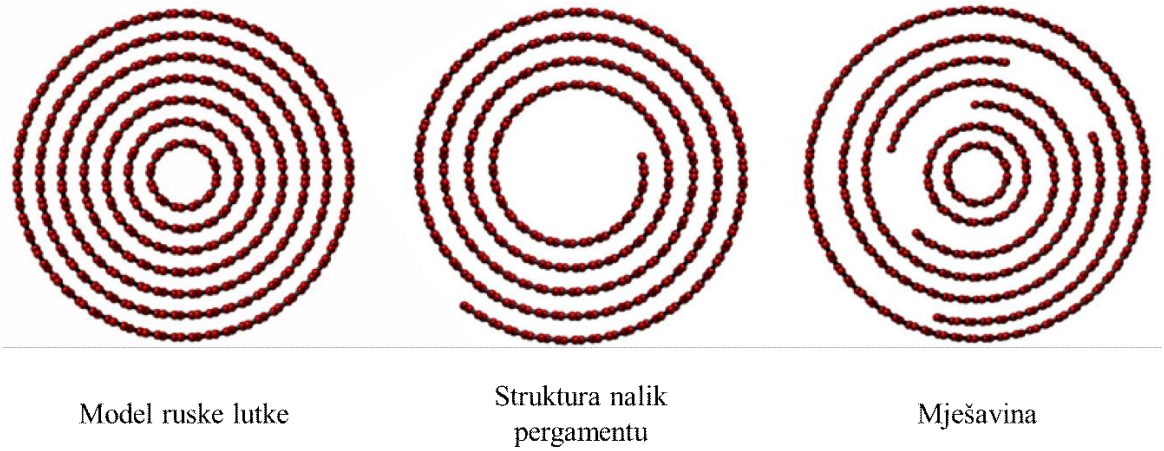
2.4.1. Karakteristike ugljikovih nanocijevi

SWCNT i MWCNT imaju jednu odnosno nekoliko koncentričnih cijevi, sa zajedničkom osi duž duljine pojedinačne nanocijevi. Veći omjer dužine i promjera cijevi važna je karakteristika CNT-a za njihovu korisnost u širokoj primjeni. Važno je napomenuti kako su CNT elektrokemijski aktivne zbog asimetrične raspodjele elektronskih oblaka oko njih, koji osiguravaju bogatu konjugaciju π elektrona duž stijenki CNT-a. Nadalje, elektronička svojstva SWCNT-a kontroliraju se njezinim smjerom omatanja, tj. kiralnosti [25]. To je tako jer iz kuta omatanja grafenskog lista proizlazi poredak π orbitala. Način omatanja grafenske ploče predstavlja par indeksa (n, m) koji se nazivaju kiralni vektori (kiralni vektor je linearna kombinacija dva jedinična vektora rešetke $\vec{a}$ i $\vec{b}$ tako da se struktura SWCNT može opisati $\vec{c} = n\vec{a} + m\vec{b}$ gdje brojevi (n, m) označuju broj koraka u smjeru jediničnih vektora $\vec{a}$ i $\vec{b}$). Odnos rotirajuće osi na heksagonsku mrežu grafenske ploče te radijus koji zatvara cilindar daju različite tipove SWCNT-a, koji se razlikuju u svojim svojstvima. SWCNT mogu se podijeliti u tri različite kategorije a to su: cik-cak (eng. *zig-zag*), fotelja (eng. *armchair*) i treći i najčešći kiralni (eng. *chiral*) [25, 27]. Sve su tri prikazane na slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz smotanog grafena u SWCNT koji formira tri strukturne kategorije: ***(a)*** *cik cak;* ***(b)****kiralni oblik;* ***(c)*** *fotelja [26].*

MWCNT je nekoliko koncentrično omotanih grafenskih listova koji okružuju šuplju jezgru. Zbog sp^2 hibridizacije u MWCNT, stvara se delokalizirani oblak elektrona duž stijenke koji je odgovoran za interakcije između susjednih cilindričnih slojeva. Zbog toga su MWCNT manje fleksibilne i imaju više strukturnih oštećenja. One mogu biti podijeljene u tri kategorije prema rasporedu njihovih cilindričnih slojeva: jedna ima strukturu nalik pergamentu koja se sastoji od grafenske ploče zamotane oko nje, druga je poznata kao ruski model lutke gdje su raspoređeni slojevi grafenskih ploča unutar koncentrične strukture, a treća je mješavina prve dvije i te su kategorije prikazane na slici 9 [22, 27].



Slika 9. Strukture MWCNT [28].

2.4.2. Funkcionalizacija ugljikovih nanocijevi

Za biološku i biomedicinsku primjenu, veliki je problem predstavljala slaba disperzibilnost CNT u vodenom mediju. Kako bi se taj problem riješio, znanstvenici su modificirali površinu CNT, odnosno napravljena je funkcionalizacija. S različitim molekulama to je postignuto apsorpcijom, elektrostatskim interakcijama ili kovalentnim vezanjem različitih molekula i kemija koje CNT čine hidrofilnijima. Kroz takve modifikacije, poboljšana je njihova disperzibilnost u vodi te je njihov profil biokompatibilnosti potpuno izmijenjen. Nadalje, agregacija pojedinih nanocijevi van der Walsovim silama također je smanjena funkcionalizacijom njihove površine. Što se tiče toksičnosti CNT, iz nekih je istraživanja vidljivo kako se funkcionalizacijom SWCNT kovalentnom metodom s fenil-SO_3H ili fenil-$(COOH)_2$ skupinama dobiju manje toksični učinci nego vodenom disperzijom nemodificiranih SWCNT stabiliziranih tenzidom. Također je uočeno kako se citotoksičnost modificiranih SWCNT smanjuje s povećanjem stupnja funkcionalizacije duž njihove stijenke [24].

2.4.3. Kompozit kitozana i ugljikovih nanocijevi

U zadnjih nekoliko godina, kitozan je privukao puno pažnje zbog svojih sjajnih svojstava kao što su biorazgradivost, biokompatibilnost, pogodnost za rast u stanici, elektrokemijska svojstva i apsorptivnost za metalne ione. Ta svojstva čine njegovu primjenu mogućom u ortopediji, senzorima, nanonosačima i pročišćavanju voda. No, niska poroznost za aktivno vezanje reaktanta i loša mehanička svojstva materijala temeljenih na kitozanu

limitirala su njihovu daljnju primjenu u tim područjima [29]. Do danas su za poboljšanje mehaničkih svojstava bile korištene metode umrežavanja različitim umreživačima, kao što su glutaraldehid i epiklorhidrin. No takve metode rezultiraju samo umjerenim poboljšanjima, a ponekad uz to i smanjuju apsorpcijski kapacitet. Zato su se zadnje vrijeme počele koristiti CNT za poboljšanje njihovih mehaničkih svojstava [29].

Hidrogelovi su također opsežno proučavani za različite moguće in vivo primjene. Velika količina vode i mekana gumasta fleksibilnost hidrogelova čine ih prikladnim za implantate bez iritiranja okolnog tkiva. Moguće primjene hidrogelova kao biomaterijala su vrlo opsežne, a uključuju i dostavu lijekova. Dostava lijekova tako može biti omogućena pasivno (difuzijom) ili nekakvim podražajima. Osim pH i temperature, zabilježeno je kako se zarobljene kemijske vrste mogu otpustiti i kolapsom gela i električkim podražajem. Za stimulirano otpuštanje predloženo je nekoliko mehanizama koji uključuju difuziju, elektroforezu nabijenog lijeka zbog elektrostatskog odbijanja između suprotno nabijenog lijeka i primijenjenih naboja, te otpuštanje lijeka erozijom hidrogelova zbog promjene pH. Kitozan je promatran za takve sustave dostave lijekova zbog svoje kompatibilnosti i ostalih prethodno navedenih sjajnih svojstava. Također, kitozanski hidrogelovi mogu poslužiti kao medij za dostavu neutralnih, anionskih i kationskih molekula lijekova elektrostimulacijom. No kako su oni izolirajući materijali, potencijal koji se mora primijeniti je jako velik; doseže do nekoliko desetaka volti, dok je primijenjena struja samo nekoliko miliampera. Takve se visoke voltaže ne mogu tolerirati *in vivo* i potrebno je poboljšati provodljivost materijala kako bi se moglo stimulirati otpuštanje lijeka pri nižim voltažama. Jedan od načina za takvo poboljšanje je ugraditi provodljivi materijal u formulaciju polimera korištenjem provodljivog polimera ili se to može napraviti ugradnjom ugljikovih nanocijevi [4].

Tim znanstvenika Razal, J. M. i suradnici [30] prethodno su objavili rad u kojem je opisano kako je kitozan dobro diperzijsko sredstvo za SWCNT. SWCNT su obećavajući materijal zbog njihovih sjajnih električnih svojstava uključujući poboljšanu elektrokemijsku aktivnost i veliku površinu. Prisutnost ugljikovih nanocijevi utječe na svojstva kompozita. Postignuta je respektabilna razina mehaničkih svojstava i električne provodljivosti. Kompozitni se materijal također pokazao necitotoksičnim za stanice fibroblasta [4, 30]. Jedan rad u kojem je ovaj kompozit korišten za tu svrhu je rad tima znanstvenika Naficy, S. i suradnici [4].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Priprava i karakterizacija kitozanskog hidrogela

Pripravljen je kitozanski gel s glutarnom kiselinom (GA) kao umreživačem. Masa od 0,5 g kitozana (1% w/v) dispergirana je u 50 mL 2% (w/v) GA. Na 40 °C, pušteno je neka se gelira bez miješanja, a zatim je nakon 4,5 sata gel uliven u 10 puta veću količinu vode. Tako se topljivost kitozana smanjila i gel se lijepo formirao u velikoj kugli na dnu laboratorijske čaše. Gel je potom centrifugiran (5000 okretaja u minuti tijekom 2 minute), opran i ponovo centrifugiran dok pH nije bio između 7,2 i 7,4 (obično nakon 3-4 pranja). Gel je zatim preliven s 50 mL vode i pušten da nabubri 24 sata.

3.1.1. FTIR spektralna analiza kitozanskog hidrogela

FTIR spektralna analiza provedena je na sobnoj temperaturi na Thermo Nicolet 380 FT IR spektroskopu (Thermo Fisher Scientific, SAD) s tehnikom prigušene totalne refleksije (Smart Orbit dijamant ATR). Podaci su prikupljeni u rasponu valnih brojeva 4000 - 400 cm^{-1}, svaki je spektar izrađen od prosjeka 60 skeniranja s rezolucijom 4 cm^{-1}. Zrak kao pozadina uzet je prije svakog uzorka. Uzorci za analizu su pripremljeni na način da su prvo centrifugirani na 5000 o/min 3 minute (15 °C), zatim sušeni na 40 °C 24 sata u komori za sušenje i potom u vakumskom eksikatoru na 25 °C još 24 sata.

3.1.2. Određivanje ravnotežnog udjela vode u hidrogelu

Osušeni uzorak hidrogela odvagan je na analitičkoj vagi i smješten u staklenu bocu za uzorke sa zatvaračem. U staklenoj boci za uzorke dodana je poznata količina PBS pufera (eng. *Phosphate buffered saline*, PBS) pH = 7,4 pri sobnoj temperaturi i ostavljen je da bubri. Nakon 72 sata višak pufera je dekantiran i određena je masa nabubrenog hidrogela pomoću koje je izračunat udio vode u hidrogelu.

3.1.3. Reološka karakterizacija hidrogela

Reološka analiza hidrogelova provedena je na University of Pécs, Institute for Pharmaceutical technology and Biopharmacy, pomoću rotacijskog viskozimetra (Rheolab QC, Anton Paar, Anton Paar GmbH, Graz, Austrija), pomoću koncentričnog cilindričnog mjernog sustava (CC27-SN16152) i softvera Rheoplus®. Za snimanje krivulja toka i viskoznosti prikupljeni su podaci o smičnom naprezanju i prividnoj viskoznosti u funkciji brzine smicanja. Brzina smicanja varirala je između 20 i 1200 s^{-1} za uzlazne krivulje, te između 1200 i 20 s^{-1} za silazne krivulje. Mjerenje je trajalo 600 sekundi s 50 mjernih točaka u oba slučaja.

3.2. Priprava i karakterizacija suspenzije ugljikovih nanocijevi

Pripremljeno je šest suspenzija CNT po 3mL s pH vrijednostima 5, 6, 7, 8, 9 i 10 kako bi se provjerilo pri kojoj pH vrijednosti suspenzija ima najveću homogenost. Korištene CNT funkcionalizirane su COOH skupinama (Multi-Walled Carbon Nanotubes, -COOH functionalized, CNT-COOH, Io-Li-Tec nanomaterials; OD: 30-50 nm; L: 10-20 μm; 95%).

Suspenzija od pH = 5 pripravljena je miješanjem koncentrirane HCl (W = 37%, ρ = 1,18 kg/dm^3) i otopine NaCl koncentracije $1{,}1*10^{-3}$ mol/dm^3, te dodatkom ≈ 0,008g ugljikovih nanocijevi funkcionaliziranih s COOH skupinama. Suspenzija pH vrijednosti 6 pripravljena je miješanjem otopine HCl koncentracije 10^{-5} mol/dm^3 s otopinom NaCl koncentracije $1{,}1*10^{-3}$ mol/dm^3, te dodatkom ≈ 0,008g CNT–COOH. Suspenzija pH = 7 pripravljena je samo miješanjem otopine NaCl koncentracije $1{,}1*10^{-3}$ mol/dm^3, te dodatkom ≈ 0,008g CNT–COOH. Prije pripravljanja suspenzije pH 8 prvo je pripremljena otopina NaOH koncentracije 0,1 mol/dm^3 iz koje je zatim pripravljena otopina NaOH koncentracije 10^{-4} mol/dm^3. Njezinim miješanjem s otopinom NaCl koncentracije $1{,}1*10^{-3}$ mol/dm^3, te dodatkom ≈ 0,008g CNT–COOH pripravljena je suspenzija pH = 8. Za suspenziju pH = 9 pomiješana je otopina NaOH koncentracije 10^{-5} mol/dm^3 i otopine NaCl koncentracije $1{,}1*10^{-3}$ mol/dm^3, te dodatkom ≈ 0,008g CNT–COOH. Za pripremu suspenzije pH = 10 pomiješana je otopina NaOH koncentracije 10^{-6} mol/dm^3 i otopine NaCl koncentracije $1{,}1*10^{-3}$ mol/dm^3, te dodatkom ≈ 0,008g CNT–COOH. Za pripremu svake suspenzije korištena je otopina NaCl, koncentracije $1{,}1*10^{-3}$ mol/dm^3 kako bi ionska jakost svih suspenzija bila jednaka. Vrijednost pH svake suspenzije morao se dodatno ugađati dodatkom

otopine HCl koncentracije 1 mol/dm^3 kod suspenzija pH vrijednosti 5 i 6, odnosno koncentriranijih otopina NaOH kod suspenzija pH = 8, 9 i 10.

Suspenzije u svim staklenim bocama za uzorke potom su dobro ručno promućkane, a zatim stavljene na ultrazvučnu kupelj na 10 min kako bi se homogenizirale.

3.3. Priprava i karakterizacija kompozitnog hidrogela i zarobljavanje inzulina

Pripravljen je 0,5 % kitozanski hidrogel iz ranije pripravljenog kitozanskog hidrogela s GA, koncentracije 10 mg/mL u staklenoj boci za uzorke od 8 mL. Za pripravu je korišteno 4 mL, 10 mg/mL kitozanskog hidrogela pripremljenog s GA i 4 mL otopine HCl pH vrijednosti 3,3. Pripremljeni hidrogel homogeniziran je ručno, a zatim stavljen na miješalicu i zagrijavan na otprilike 25 ºC i 40 min.

Zatim je hidrogelu dodan inzulin. Za pripravu je korišten ljudski inzulin iz ampula koje sadrže 100 IU/mL u 3mL čije je pakiranje vidljivo na slici 10., 0,5 %-tni hidrogel i destilirana voda. Za pripravu su korišteni omjeri iz tablice 1.



Slika 10. Prikaz pakiranja iz kojeg je korišten inzulin.

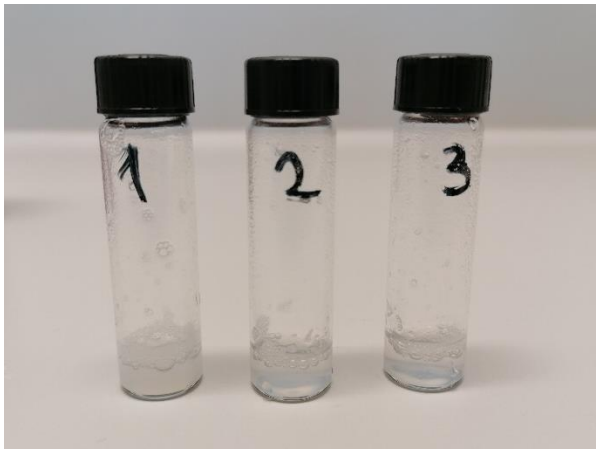
Tablica 1. Omjeri hidrogela, inzulina i vode korišteni za pripravu.

	V(0,5 % kitozanski hidrogel) [µL]	*V*(100 IU/mL inzulin) [µL]	*V*(destilirana voda) [µL]
1	500	500	-
2	500	50	450
3	500	5	495

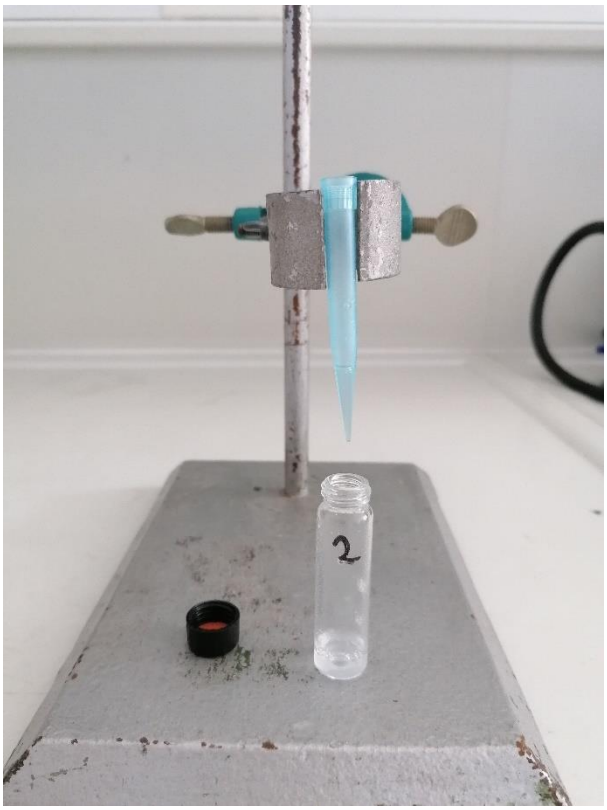
Kada su uzorci pomiješani, svaki je ručno homogeniziran i zatim su stavljeni u UZV kupelj na 10 minuta. Nakon toga napravljeno je grubo ispitivanje razlike u viskoznosti triju uzoraka. Potom je izmjerena relativna viskoznost svakog uzorka posebno i 0,5 %-tnog hidrogela koji je korišten za pripremu uzoraka.

3.4. Određivanje relativne viskoznosti kompozita hidrogel-inzulin

Određena je relativna viskoznost prethodno pripravljena tri kompozita hidrogel inzulin prikazana na slici 11. Mjerenje je napravljeno tako da je 600 μL kompozita propušteno kroz nastavak za pipetu kako je prikazano na slici 12., te je mjereno vrijeme potrebno za prolazak uzorku. Za svaki je uzorak napravljeno pet ponavljanja, a rezultati su prikazani u tablici 2.



Slika 11. Kompoziti hidrogel-inzulin pripravljeni u tri različita omjera hidrogela, inzulina i vode.



Slika 12. Aparatura za mjerenje relativne viskoznosti kompozita kitozanski hidrogel-inzulin.

Tablica 2. Vrijeme potrebno t/s uzorku da prođe kroz nastavak za pipetu.

		t / s				
Ponavljanje	Uzorak	1	2	3	0,5 % kitozanski hidrogel	Glicerol
1		05,73	05,01	04,57	06,30	57,24
2		05,77	04,54	04,55	06,27	51,51
3		05,66	04,65	04,56	06,28	58,07
4		05,63	04,48	04,40	06,20	1:05,90
5		06,32	04,50	04,36	06,31	01:14,62
Srednja vrijednost:		05,822	04,636	04,488	06,272	01:01,468

Pomoću srednjih vrijednosti vremena za gelove (t_2) izračunata je relativna viskoznost prema jednadžbi 1 svakog pojedinog kompozita uz pomoć vrijednosti za glicerol (ρ_2 i t_2), te kada su one međusobno uspoređene može se izračunati kako je viskoznost kompozita 1 najveća, te je taj omjer inzulina i hidrogela dalje korišten.

$$\eta_{rel} = \frac{\rho_1 * t_1}{\rho_2 * t_2} \quad (1)$$

3.5. Priprava kompozita kitozanski hidrogel–ugljikove nanocijevi

Prvo je pripravljen kompozit masenog omjera 1:2 ugljičnih nanocijevi i kitozana. U staklenoj boci za uzorke pomiješano je 25 mg CNT-COOH i 5 mL kitozanskog gela pripremljenog s GA koncentracije 10 mg/mL. Kompozit je stavljen na UZV kupelj 2 min. Zatim je *drop casting* metodom napravljen film na pokrovnom stakalcu i ostavljen 30 min na sušenju na zraku. Drugi je pripravljen kompozit masenog omjera 1:1 CNT-COOH i kitozana. U staklenoj boci za uzorke pomiješano je 25 mg CNT-COOH i 2,5 mL kitozanskog gela pripremljenog s GA koncentracije 10 mg/mL. Kompozit je stavljen na UZV kupelj 2 min. Potom je stavljen na grijaču ploču 2h na temperaturu 60 ºC i uključena je magnetska miješalica na 400 rpm.

Za treći kompozit korištena je 2 %-tna suspenzija CNT-COOH, pH vrijednosti 9. Ta je suspenzija promućkana te stavljena na UZV kupelj 2 h. Nakon što je odstajala 2 h pripravljen je kompozit masenog omjera 1:1 tako da je na 1 mL te suspenzije dodano 4 mL 0,5 %-tnog, prethodno pripravljenog kitozanskog gela. Kompozit je potom stavljen u UZV kupelj 30 min.

Četvrti je kompozit pripremljen na isti način, miješanjem 500 µL prethodno pripremljenog trećeg kompozita od 2 %-tne suspenzije ugljikovih nanocijevi, pH = 9 i 0,5 %-tnog kitozanskog hidrogela. Kompozit je homogeniziran, a potom stavljen na UZV kupelj 10 min. No ovaj je zakiseljen do pH ≈ 4 pomoću otopine HCl koncentracije 1 mol/L.

3.6. Priprava kompozita kitozanskog hidrogela s ugljikovim nanocijevima i zarobljavanje inzulina

Kompozit s nereguliranim pH pripravljen je miješanjem 500 µL prethodno pripremljenog trećeg kompozita od 2 %-tne suspenzije ugljikovih nanocijevi, pH = 9 i 0,5 %-tnog kitozanskog hidrogela s 500 µL inzulina. Kompozit je homogeniziran, a potom stavljen na UZV kupelj 10 min.

Kompozit s reguliranim pH pripravljen je miješanjem 500 µL prethodno pripremljenog trećeg kompozita od 2 %-tne suspenzije ugljikovih nanocijevi, pH = 9 i 0,5

%-tnog kitozanskog hidrogela s 500 μL inzulina. Kompozit je homogeniziran, a potom stavljen na UZV kupelj 10 min. No ovaj je zakiseljen do pH ≈ 4 pomoću otopine HCl koncentracije 1 mol/L.

3.7. Priprava pufera

Korištena je otopina PBS, koncentracije 0,1 mol/L i pH = 7,4. Za pripravu 200 mL pufera izmjerene su mase m_1 (NaH_2PO_4*$2H_2O$) = 0,593 g i m_2 (Na_2HPO_4*$2H_2O$) = 2,88 g i zatim dodane u tikvicu nakon čega je dodana destilirana voda do oznake i promiješano sve dok se krutine nisu potpuno otopile.

3.8. Elektrokemijsko određivanje inzulina

3.8.1. Amperometrijsko određivanje inzulina – kalibracijska linija

Za određivanje kalibracijske linije inzulina, u improvizirani Faraday-ev kavez postavljena je magnetska miješalica na koju je postavljena čaša s otopinom i dodavanim inzulinom. U nju je postavljen magnet, te je uronjena elektroda, spojena na EDAQ potenciostat koji je spojen na prijenosno računalo i koristi EChemTM softver. Korištena elektroda kod prva tri mjerenja je *screen printed carbon* elektroda s troelektrodnim sustavom pripravljena s grafenskom pastom. Kod svih mjerenja primijenjen je potencijal od 0,70 V, samo je mijenjan raspon promatrane struje i količina dodanog inzulina. Sve su otopine konstantno miješane.

Za prvo mjerenje u čašu je stavljeno 10 mL otopine NaCl koncentracije 0,1 mol/L pripravljene s PBS puferom. Dodavan je alikvot od 10 μL inzulina, a promatrani raspon struje je 20 μA.

Za drugo mjerenje u čašu je ponovo dodano 10 mL otopine NaCl koncentracije 0,1 mol/L pripravljene s PBS puferom. Ovaj je put dodavan alikvot inzulina bio 5 μL, a raspon promatrane struje 10 μA.

Za treće mjerenje u čašu je ponovo dodano 10 mL otopine NaCl koncentracije 0,1 mol/L pripravljene s PBS puferom. Alikvot inzulina koji je dodavan je 1 μL, a raspon promatrane struje 500 nA.

Za četvrto mjerenje korištena je *screen printed carbon* elektroda modificirana kompozitnim filmom kitozan – CNT tako da je, 10 μL tog kompozita naneseno na radnu elektrodu *screen printed carbon* elektrode *drop casting* metodom i ostavljeno ≈ 20 min kako bi se osušilo na zraku

Za četvrto mjerenje je u čašu dodano 10 mL PBS pufera. Alikvot inzulina koji je dodavan je 1 μL, ali za mjernu elektrodu je korištena *screen printed carbon* elektroda modificirana kompozitom kitozanski hidrogel–CNT.

Za peto mjerenje kalibracijske krivulje u čistu je otopinu pufera dodano je 5 alikvota po 2 μL inzulina, ali je mjerenje rađeno pomoću elektrode od staklastog ugljika i pri -0,60 V. Elektroda od staklastog ugljika je korištena kao radna elektroda, za referentnu elektrodu je korištena Ag/AgCl, a protuelektroda je platinska žica.

3.8.2. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija izvedena je pomoću EDAQ potenciostata i EDAQ e-cordera 401 spojenog na prijenosno računalo koje koristi EChemTM softver. Za sve eksperimente korištene su *screen printed carbon* elektrode s troelektrodnim sustavom pripremljene s grafenskom pastom. Kao inertni elektrolit korištena je PBS otopina 0,1 mol/L (pH = 7,4 pri 25 ºC). U improvizirani Faraday-ev kavez postavljena je čaša u koju je uronjena elektroda.

U prvom mjerenju u čašu je stavljeno 15 mL PBS otopine i dodavan je alikvot 1 μL inzulina.

U drugom mjerenju također je dodano 15 mL PBS pufera u čašu ali je dodavani alikvot inzulina 10 μL.

U trećem mjerenju u čaši je pripremljeno 10 mL svježeg PBS pufera provjerenog pH koji je ≈ 7,4. Alikvot dodavanog inzulina je 10 μL.

3.8.3 Otpuštanje inzulina

3.8.3.1. Mjerenje otpuštenog inzulina amperometrijom

Otpuštanje inzulina je ispitano na nekoliko različitih načina. Prvo je *screen printed carbon* elektroda modificirana kompozitnim filmom kitozan–CNT s inzulinom tako da je, 10 μL tog kompozita naneseno na radnu elektrodu *screen printed carbon* elektrode *drop casting* metodom i ostavljeno ≈ 20 min kako bi se osušilo na zraku.

Za prvo mjerenje modificirana elektroda i mjerna nemodificirana elektroda obje su uronjene u čašu s pripremljenih 20 mL PBS pufera i namještene na što manju udaljenost, okrenute jedna prema drugoj. Čaša se nalazi na magnetskoj miješalici koja se nalazi unutar improviziranog Faraday-evog kaveza.

Elektrode su tako ostavljene kako bi se inzulin otpuštao pasivnom difuzijom 1h. Mjerenje inzulina je odrađeno nemodificiranom *screen printed carbon* elektrodom pomoću EDAQ e-cordera 401 koji je spojen na prijenosno računalo i koristi EChemTM softver. Mjerenje je rađeno uz miješanje.

Za drugo mjerenje, elektrode su jednako postavljene, ali modificirana je elektroda još spojena na EDAQ potenciostat i dan je jedan puls potencijala 0,60 V dug oko 5 s. Za mjerenje inzulina korištena je nemodificirana *screen printed carbon* elektroda spojena na EDAQ e-corder 401 koji je spojen na prijenosno računalo i koristi EChemTM softver. Mjerenje je rađeno uz miješanje.

3.8.3.2. Mjerenje otpuštenog inzulina voltametrijom s linearnom promjenom potencijala (*eng*. linear sweep)

Uz difuziju. U improvizirani Faraday-ev kavez postavljena je magnetska miješalica na koju se postavi čaša s 10 mL unaprijed pripremljenog PBS pufera. U nju se prvo uronila samo modificirana elektroda s kompozitnim filmom koji sadrži inzulin. Ostavljena je u puferu 15 min. Nakon 15 min elektroda je izvađena, otopina je dobro promiješana magnetskom miješalicom. Mjerenje je zatim napravljeno pomoću mjerne elektrode koja je modificirana pH reguliranim kompozitom kitozan-CNT. Difuzija, odnosno mjerenje, ponovljeno je još 5 puta, svaki nakon 15 min.

Elektroda modificirana kompozitnim filmom kitozan–CNT s inzulinom ostavljena je zatim u otopini pufera preko noći, otprilike 12-13 h, te je nakon toga opet ponovljeno mjerenje na isti način.

Uz elektromodulaciju. U improvizirani Faraday-ev kavez postavljena je magnetska miješalica na koju se postavi čaša s 10 mL unaprijed pripremljenog PBS pufera. U nju se prvo uronila samo modificirana elektroda s kompozitnim filmom koji sadrži inzulin. Prvo je primijenjen potencijal od -0,80 V u trajanju od 5 min. Ta je elektroda izvađena, otopina je dobro promiješana magnetskom miješalicom i mjerenje je napravljeno pomoću mjerne elektrode koja je modificirana pH reguliranim kompozitom kitozan-CNT. Postupak je ponovljen još tri puta. Trajanje intervala je zatim podignuto na 15 min i to je mjerenje

napravljeno 2 puta. A zatim je trajanje intervala ponovo produženo na 30 min i na isti način izmjereno.

Potencijal je zatim promijenjen na 0,70 V i cijeli postupak mjerenja ponovljen s jednakim intervalima od 5, 15 i 30 min.

Promijenjen je potencijal na 0,25 V i cijeli postupak mjerenja je ponovljen s jednakim intervalima od 5, 15 i 30 min.

Promjena načina modifikacije elektrode za otpuštanje inzulina. Nakon toga promijenjen je način na koji se modificira *screen printed carbon* elektroda s kompozitnim filmom kitozan–CNT s inzulinom. Elektroda je modificirana tako da je na elektrodu prvo *drop casting* metodom naneseno 10 μL suspenzije kompozita kitozan–CNT s inzulinom, a zatim je ta kapljica okružena na jednaki način otopinom NaOH koncentracije 0,01 mol/L i elektroda je ostavljena da se osuši.

Uz difuziju. U improvizirani Faraday-ev kavez postavljena je magnetska miješalica na koju se postavi čaša s 10 mL unaprijed pripremljenog PBS pufera. U nju se prvo uronila samo novo modificirana elektroda s inzulinom. Elektroda je ostavljena u puferu 1h. Nakon toga elektroda je izvađena, otopina je dobro promiješana magnetskom miješalicom. Mjerenje je zatim napravljeno pomoću elektrode od staklastog ugljika. Elektroda od staklastog ugljika je korištena kao radna elektroda, za referentnu elektrodu je korištena Ag/AgCl, a protuelektroda je platinska žica. Potom je mjerenje ponovljeno nakon što je elektroda s inzulinom ostavljena još 1h.

Uz elektromodulaciju. U improvizirani Faraday-ev kavez postavljena je magnetska miješalica na koju se postavi čaša s 10 mL unaprijed pripremljenog PBS pufera. U nju se prvo uronila samo modificirana elektroda s inzulinom. Primijenjen je potencijal od -0,60 V i ostavljeno je 1 h. Nakon toga elektroda je izvađena, otopina je dobro promiješana magnetskom miješalicom. Mjerenje je zatim izvedeno pomoću elektrode od staklastog ugljika. Elektroda od staklastog ugljika je korištena kao radna elektroda, za referentnu elektrodu je korištena Ag/AgCl, a protuelektroda je platinska žica. Potom je mjerenje ponovljeno nakon što je elektroda s inzulinom ostavljena još 1 h.

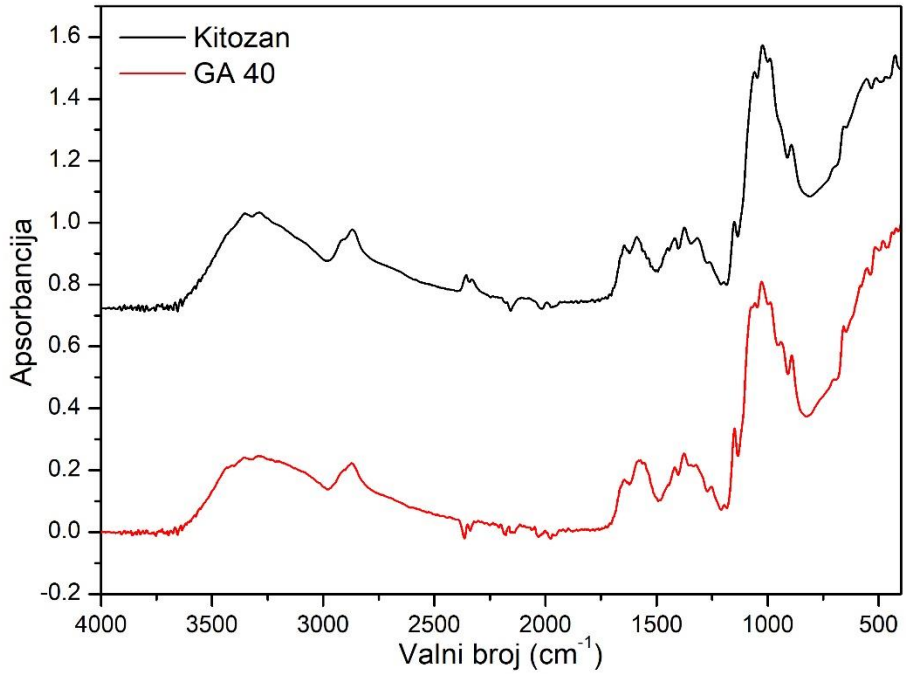
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija pripravljenog kitozanskog hidrogela

4.1.1. FTIR spektralna analiza kitozanskog hidrogela

Na slici 13. prikazani su FTIR spektri kitozana i hidrogela. Spektri su analizirani na osnovi ranijih istraživanja [31] i identificirani su svi vibracijski vrhovi karakteristični za kitozan. Učinkovitost umrežavanja dokazana je uspoređivanjem vrhova karakterističnih za vibracije amidne veze u kitozanu i hidrogelu. Vibracija svijanja izvan ravnine C = O skupine vidljiva je na 1654 cm^{-1}. Oštar vrh niskog intenziteta na 1550 cm^{-1} identificiran je kao vibracije savijanja N-H u ravnini i vibracije istezanja C-N veze koje se preklapaju. Vrh 1386 cm^{-1} pokazuje preklapanje vibracija svijanja u ravnini N-H veze i istezanja C-N veze, Daljnji karakteristični vrh za amidnu vezu vidi se kod 1080 cm^{-1}, koji je na spektru kitozana vidljiv samo kao rame ostalim vrhovima. Na 2886 cm^{-1} mogu se vidjeti simetrične i asimetrične CH_2 vibracije, koje se pripisuju istezanju C-H veze u piranoznom prstenu. Široki vrh srednjeg intenziteta na 3292 cm^{-1}, pripada simetričnom rastezanju–NH_2 funkcionalne skupine. U spektrima kitozana, oštar vrh niskog intenziteta može se vidjeti na 3744 cm^{-1}, što je karakteristična frekvencija vibracija izvan ravnine slobodne N-H veze sekundarnih amina.

Kao dokaz da je kitozan uspješno umrežen i da je nastao hidrogel, korišten je omjer intenziteta vrhova na 1080 cm cm^{-1} i 2886 cm cm^{-1}, jer se vrh na 2886 cm cm^{-1}, može smatrati unutarnjim standardom čiji se intenzitet ne mijenja prilikom umrežavanja. Na taj način ustanovljeno je da je kitozan kemijski umrežen glutarnom kiselinom jer taj omjer je kod čistog kitozana 1,82 a kod umreženog hidrogela 3,22.



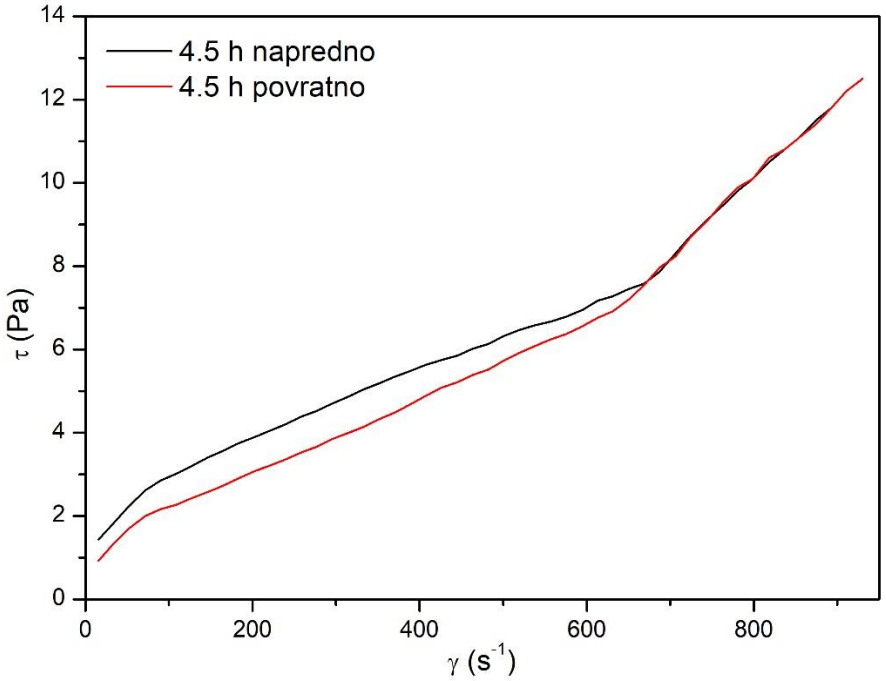
Slika 13. FTIR spektri kitozana i hidrogela umreženog glutarnom kiselinom na 40 °C.

4.1.2. Određivanje ravnotežnog udjela vode u hidrogelu

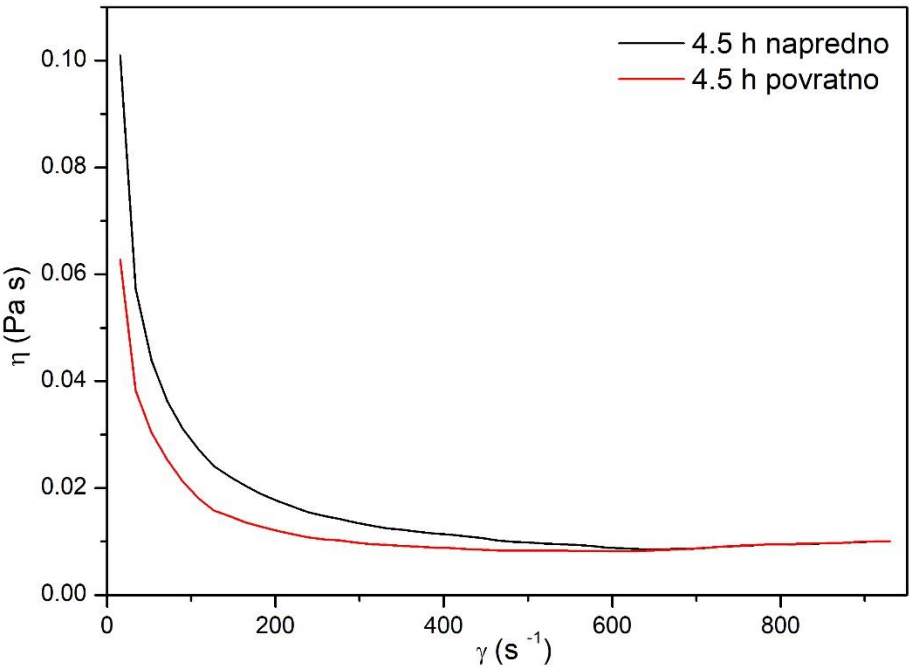
Ravnotežni udio vode u hidrogelu izračunat je na osnovi mase suhog i potpuno nabubrenog hidrogela. Ustanovili smo da potpuno nabubreni hidrogel sadrži 97 % vode od ukupne mase.

4.1.3. Reološka karakterizacija hidrogela

Na slici 14. prikazana je krivulja toka na kojoj se vidi da se hidrogel ponaša kao strukturno viskozan reološki sustav, koji ima granicu toka i histerezu smične sile na povratnoj grani grafa što ga čini tiksotropnim sustavom. Na slici 15. prikazana je krivulja viskoznosti. Povećanjem smične brzine viskoznost se smanjuje, na povratnoj grani krivulje vidljiva je histereza viskoznosti što je tipično ponašanje blago umreženih hidrogelova.



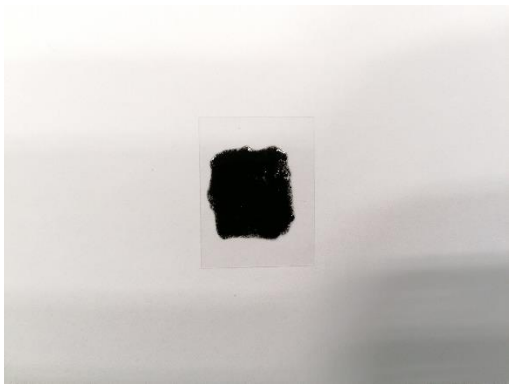
Slika 14: Krivulja toka sintetiziranog hidrogela.



Slika 15. Krivulja viskoznosti sintetiziranog hidrogela.

4.2. Priprava kompozitnog filma kitozan–ugljične nanocijevi za kontrolirano otpuštanje inzulina

Prvo je pripravljen kompozit masenog omjera 1:2 CNT i kitozana. Ali u tom kompozitu ugljikove nanocijevi nisu bile homogeno dispergirane stoga je pripravljen drugi kompozit masenog omjera CNT-COOH i kitozana 1:1. Tu je disperzibilost bila puno bolja i dobiven je homogeniji kompozit, no ponovo nedovoljno homogen. Osušeni filmovi tih kompozita prikazani su na slici 16.

(a)  (b) 

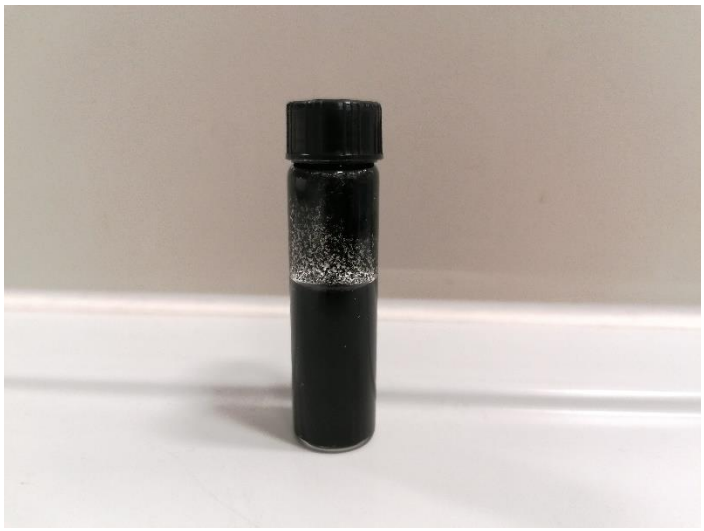
Slika 16. (a) kompozit masenog omjera CNT i kitozana 1:2 i (b) kompozit masenog omjera CNT i kitozana 1:1.

Disperzibilnost CNT-COOH ovisi i o deprotonaciji karboksilnih skupina stoga je ispitan utjecaj pH na diperzibilnost. U tu svrhu pripremljeno je šest suspenzija CNT-COOH sa šest različitih pH vrijednosti, od pH = 5 do pH = 10. Njihovom usporedbom vidljivo je odmah kako je pri pH = 9 disperzibilnost CNT najbolja što je vidljivo na slici 17.



Slika 17. Suspenzije CNT-COOH od pH = 5 do pH = 10.

Ta je suspenzija zatim ponovo pripravljena u masenom omjeru 1:1, korištenjem 2 %-tne suspenzije CNT-COOH i 0,5 %-tnog, prethodno pripravljenog kitozanskog gela. Pri toj ponovljenoj pripravi, suspenzija je držana u UZV kupelji oko 2h i nakon toga sedimentacija CNT nije gotovo uopće bila vidljiva, dakle njihova homogenost dispergiranosti bila je bolja nego u bilo kojoj od prethodno pripravljenih šest suspenzija i to je vidljivo na slici 18.



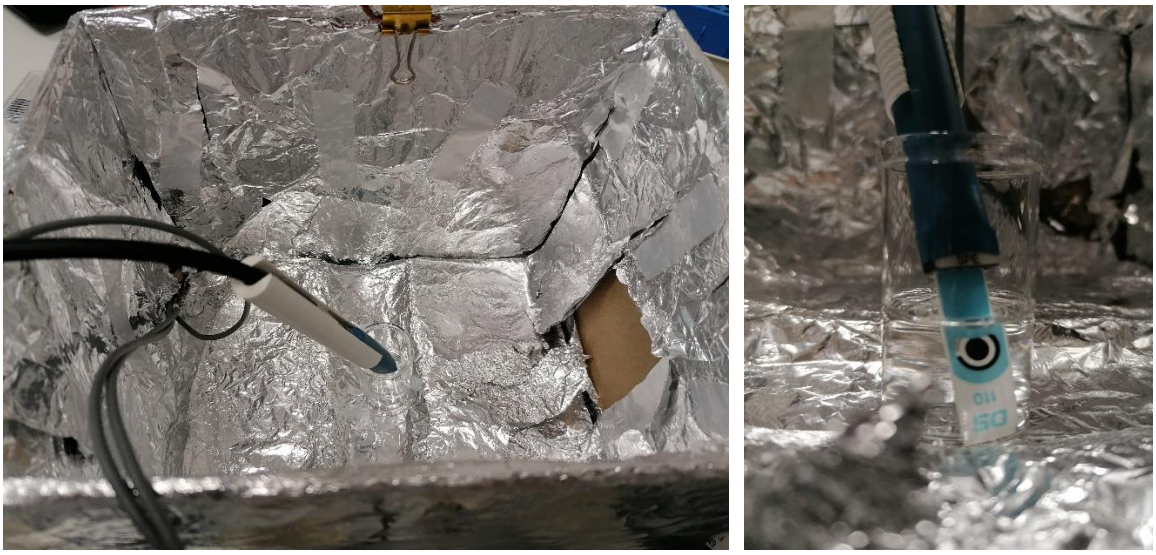
Slika 18. Nanovo pripravljena suspenzija CNT-COOH u kitozanskom gelu u masenom omjeru 1:1.

Sljedeće je provjereno ima li inzulin utjecaj na viskoznost hidrogela kitozana u kojem se nalazi. To je napravljeno tako da su pripremljena tri kompozita kitozanskog hidrogela s tri različite koncentracije inzulin. Prema dobivenim rezultatima vidljiva je razlika u viskoznosti između tri kompozita. Kompozit s najvećom koncentracijom inzulina je puno viskozniji od kompozita s najmanjom koncentracijom inzulina. Čini se kako amino i hidroksilne skupine iz inzulina imaju potencijal povećati broj međumolekulskih vodikovih veza u kitozanskom hidrogelu što povećava umreženost mreže hidrogela. To je primijećeno i u radu *In Vitro* Insulin Release from Thermosensitive Chitosan Hydrogel [32], tima Elham Khodaverdi, i suradnici u kojem su uspoređivali kako količina inzulina utječe na vrijeme gelacije kitozanskog gela.

Uz prethodne zaključke pripremljen je kompozit kitozan–CNT korištenjem 500 μL 2 %-tne suspenzije CNT, pH = 9 i 0,5 %-tnog kitozanskog hidrogela s 500 μL inzulina. No nakon priprave nije ponovo reguliran pH.

4.3. Elektrokemijsko određivanje inzulina

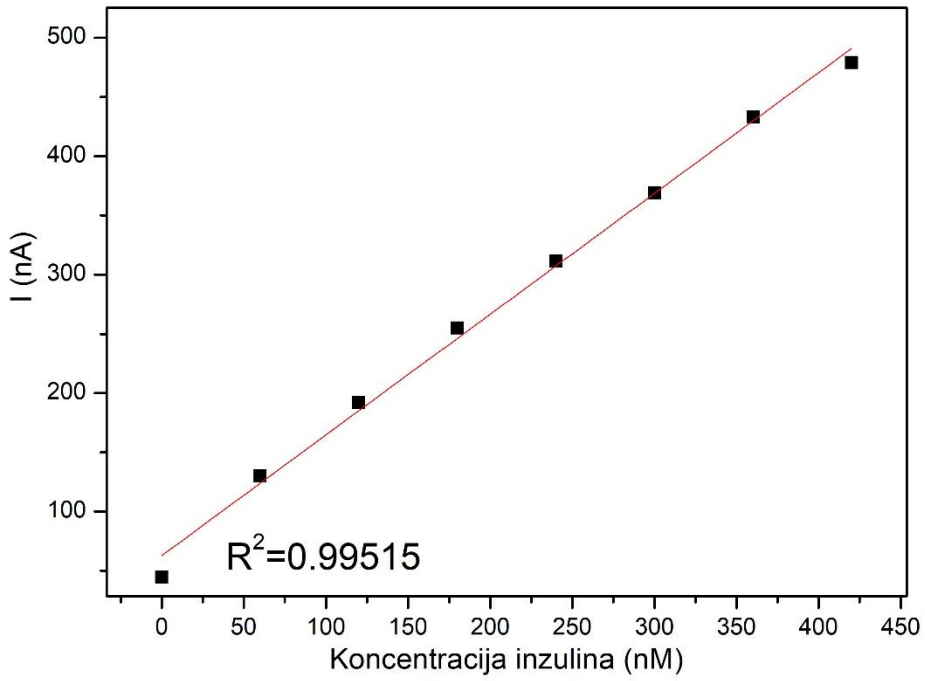
Prvotni plan za određivanje inzulina bio je korištenje amperometrije. Sustav je složen tako da je u improvizirani Faraday-ev kavez postavljena magnetska miješalica na koju je postavljena čaša s otopinom i dodavanim inzulinom. U nju je postavljen magnet, te je uronjena elektroda, spojena na EDAQ potenciostat koji je spojen na prijenosno računalo i koristi EChemTM softver. Korištena elektroda kod prva tri mjerenja je *screen printed carbon* elektroda s troelektrodnim sustavom pripravljena s grafenskom pastom. Taj sustav izgleda kako je prikazano na slici 19.



Slika 19. Sustav za amperometrijsko određivanje kalibracijske linije inzulina.

Kod svih mjerenja primijenjen je potencijal od 0,70 V, samo je mijenjan raspon promatrane struje i količina dodanog inzulina. Sve su otopine konstantno miješane.

Prva tri mjerenja izvedena su prvog dana i rezultat trećeg mjerenja je najbolji graf od ta tri. Za treće mjerenje u čašu je dodano 10 mL otopine NaCl koncentracije 0,1 mol/L pripravljene s PBS puferom. Alikvot inzulina koji je dodavan je 1 µL, a raspon promatrane struje 500 nA. Graf je prikazan na slici 20.



Slika 20. Graf ovisnosti struje o koncentraciji dodanog inzulina.

Kako bismo dobili bolju sliku o ponašanju inzulina u elektrolitu, te njegovoj oksidaciji i redukciji u danom elektrolitu, izvedena je i cikličku voltametrija. Zato što se može dogoditi da pri mjerenju otpuštanja inzulina pikovi ne budu samo od analita, tj. inzulina, nego i od elektrolita u kojem se nalazi, korištena je ciklička voltametrija pomoću koje je moguće selektivno odrediti inzulin. Tu su pikovi samo od analita, a pozadinski šum je od elektrolita, pa se može vidjeti mijenjaju li se samo pikovi analita, ili se mijenjaju samo pozadinski šumovi ili oboje.

Ciklička voltametrija izvedena je pomoću EDAQ potenciostata i EDAQ e-cordera 401 spojenog na prijenosno računalo koje koristi EChemTM softver. Za sve eksperimente korištene su *screen printed carbon* elektrode s troelektrodnim sustavom pripremljene s grafenskom pastom. Kao inertni elektrolit korištena je PBS otopina 0,1 mol/L (pH = 7,4 pri 25 ºC). U improvizirani Faraday-ev kavez postavljena je čaša u koju je uronjena elektroda.

U prvom mjerenju u čašu je stavljeno 15 mL PBS otopine i dodavan je alikvot 1 μL inzulina. No, dodavanjem inzulina nema nikakvih promjena. Pojavljuje se pik blizu -0,80 V, ali to je od PBS-a. Nova je otopina PBS-a zatim pripravljena, ali se pik pojavio odmah na baznom grafu.

U drugom mjerenju također je dodano 15 mL PBS pufera u čašu, ali je dodavani alikvot inzulina 10 μL. Zbog nejasnih rezultata, to je mjerenje ponovljeno i pik se stvara oko 0,4 V.

U trećem mjerenju u čaši je pripremljeno 10 mL svježeg PBS pufera provjerenog pH koji je ≈ 7,4. Alikvot dodavanog inzulina je 10 μL. Na grafu je stalno vidljiv pomak potencijala, ali je taj graf bio najuredniji do tada.

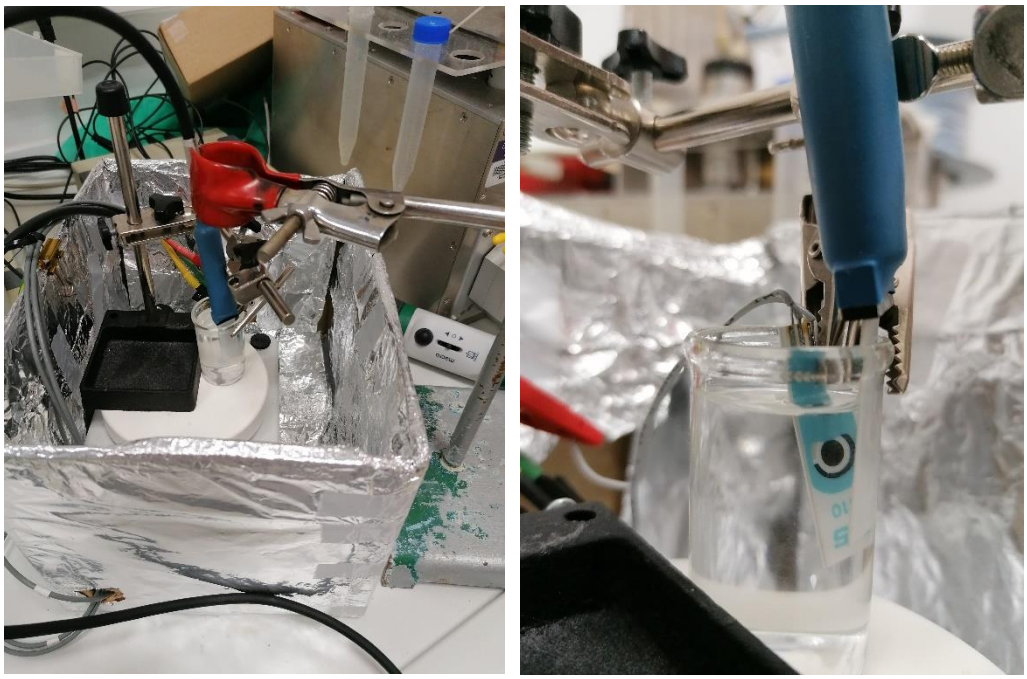
Nakon toga prvi je put isproban sustav za kontrolirano otpuštanje inzulina.

Isprobano je nekoliko različitih koncepata. Prvi je koncept pripremljen na način da je *screen printed carbon* elektroda modificirana kompozitnim filmom kitozan–CNT s inzulinom te nereguliranim pH čija je priprema prethodno opisana tako da je, 10 μL tog kompozita naneseno na radnu elektrodu *screen printed carbon* elektrode *drop casting* metodom i ostavljeno otprilike 20 min kako bi se osušilo na zraku i to je izgledalo kao na slici 21.



Slika 21. Screen printed carbon elektroda modificirana kompozitnim filmom kitozan–CNT s inzulinom.

Za mjerenje su obje elektrode, modificirana elektroda i mjerna nemodificirana elektroda uronjene u čašu s pripremljenih 20 mL PBS pufera i namještene na što manju udaljenost, okrenute jedna prema drugoj, kako je vidljivo na slici 22. Čaša se nalazi na magnetskoj miješalici koja se nalazi unutar improviziranog Faraday-evog kaveza.



Slika 22. Izgled sustava prvog koncepta za kontrolirano otpuštanje inzulina iz kompozitnog filma kitozan–CNT.

Prvo je provjeravano otpuštanje inzulina pasivnom difuzijom 1 h. Mjerenje inzulina je odrađeno nemodificiranom *screen printed carbon* elektrodom pomoću EDAQ e-cordera 401 koji je spojen na prijenosno računalo i koristi EChemTM softver. Mjerenje je rađeno uz miješanje. No nikakvi pikovi nisu vidljivi, dakle ništa inzulina nije se otpustilo.

Za drugo mjerenje, elektrode su jednako postavljene, ali modificirana je elektroda još spojena na EDAQ potenciostat i dan je jedan puls potencijala 0,60 V dug približno 5s. Za mjerenje inzulina korištena je nemodificirana *screen printed carbon* elektroda spojena na EDAQ e-corder 401 koji je spojen na prijenosno računalo i koristi EChemTM softver. Mjerenje je rađeno uz miješanje. Vidljiv je veliki pik koji upućuje na to da se sav inzulin odjednom otpustio. No, pri pokušaju ponavljanja tog mjerenja nije bilo nikakvog pika, iz čega je zaključeno kako je prvi rezultat neispravan. Do njega je vjerojatno došlo jer je elektroda bila slučajno pomaknuta.

Zbog neuspjelih prvih rezultata, odlučeno je još poraditi na samom kompozitu. Izmjeren je pH kompozita kitozan–CNT koji je oko pH = 8. U taj je kompozit zatim dodavan HCl koncentracije 1 mol/L dok pH vrijednost nije pala na pH = 3-5. Nakon homogenizacije rukom vidjelo se kako je kompozit puno homogeniji i to je vidljivo na slici 23. U daljnjem je radu samo u taj kompozit dodavan inzulin i korišten za stvaranje kompozitnog filma.



Slika 23. Kompozit kitozan–CNT i inzulin s reguliranim pH.

Također, nakon toga nije više korištena amperometrija za određivanje inzulina jer je jako puno faktora utjecalo na mjerenja. Prvenstveno je razlog što je za mjerenje inzulina potrebno konstantno miješanje otopine, a miješanjem se stanjuje difuzni sloj, zbog čega je transfer naboja usporen, što onemogućava ispravno mjerenje.

Zbog toga je mjerenje otpuštenog inzulina dalje izvođeno voltametrijom s linearnom promjenom potencijala. Prvo je provjereno otpuštanje inzulina iz kompozita difuzijom. U improvizirani Faraday-ev kavez postavljena je magnetska miješalica na koju se postavi čaša

s 10 mL unaprijed pripremljenog PBS pufera. U nju se prvo uronila samo modificirana elektroda s kompozitnim filmom koji sadrži inzulin. Ostavljena je u puferu 15 min. Nakon 15 min elektroda je izvađena, otopina je dobro promiješana magnetskom miješalicom. Mjerenje je zatim napravljeno pomoću mjerne elektrode koja je modificirana pH reguliranim kompozitom kitozan-CNT. Difuzija, odnosno mjerenje, ponovljeno je još 5 puta, svaki nakon 15 min. Elektroda modificirana kompozitnim filmom kitozan – CNT s inzulinom ostavljena je zatim u otopini pufera preko noći, otprilike 12-13 h, te je nakon toga opet ponovljeno mjerenje na isti način.

Kod ovog mjerenja pik se ne pojavljuje nego se samo bazna linija pomiče ulijevo.

Mjerenje je zatim isprobano uz elektromodulaciju. U improvizirani Faraday-ev kavez postavljena je magnetska miješalica na koju se postavi čaša s 10 mL unaprijed pripremljenog PBS pufera. U nju se prvo uronila samo modificirana elektroda s kompozitnim filmom koji sadrži inzulin. Prvo je primijenjen potencijal od -0,80 V u trajanju od 5 min. Ta je elektroda izvađena, otopina je dobro promiješana magnetskom miješalicom i mjerenje je napravljeno pomoću mjerne elektrode koja je modificirana pH reguliranim kompozitom kitozan-CNT. Postupak je ponovljen još tri puta. Trajanje intervala je zatim podignuto na 15 min i to je mjerenje napravljeno 2 puta. Zatim je trajanje intervala ponovo produženo na 30 min i na isti način izmjereno.

Potencijal je zatim promijenjen na 0,70 V i cijeli postupak mjerenja ponovljen s jednakim intervalima od 5, 15 i 30 min.

Promijenjen je potencijal na 0,25 V i cijeli postupak mjerenja je ponovljen s jednakim intervalima od 5, 15 i 30 min.

Bez obzira na to koji je potencijal sustav namješten ili koliko dugo je potencijal pušten, nikakav pik nije detektiran.

Nakon toga promijenjen je način na koji se modificira elektroda za otpuštanje inzulina. Zbog prethodnih neuspjelih rezultata, donesen je zaključak kako inzulin ostaje zarobljen u kompozitu i njegov izlazak iz kompozita se ne može olakšati samo elektromodulacijom. Vjerojatno se kompozitni film previše osuši i u puferskoj otopini ne može nabubriti, te zbog toga inzulin ne može izaći iz kompozita. Zato je promijenjen način na koji se *screen printed carbon* elektroda modificira s kompozitnim filmom kitozan–CNT s inzulinom. Umjesto da se nakon nanošenja kompozita elektroda ostavi na sušenju na zraku kako bi se stvorio film, nakon nanošenja 10 μL suspenzije kompozita kitozan–CNT s inzulinom *drop casting* metodom na elektrodu, ta je kapljica okružena na jednaki način

otopinom NaOH koncentracije 0,01 mol/L i ostavljeno da se osuši. Kitozan iz kompozita se nalazi u kiselom prije sušenja, a dodatkom NaOH je neutraliziran.

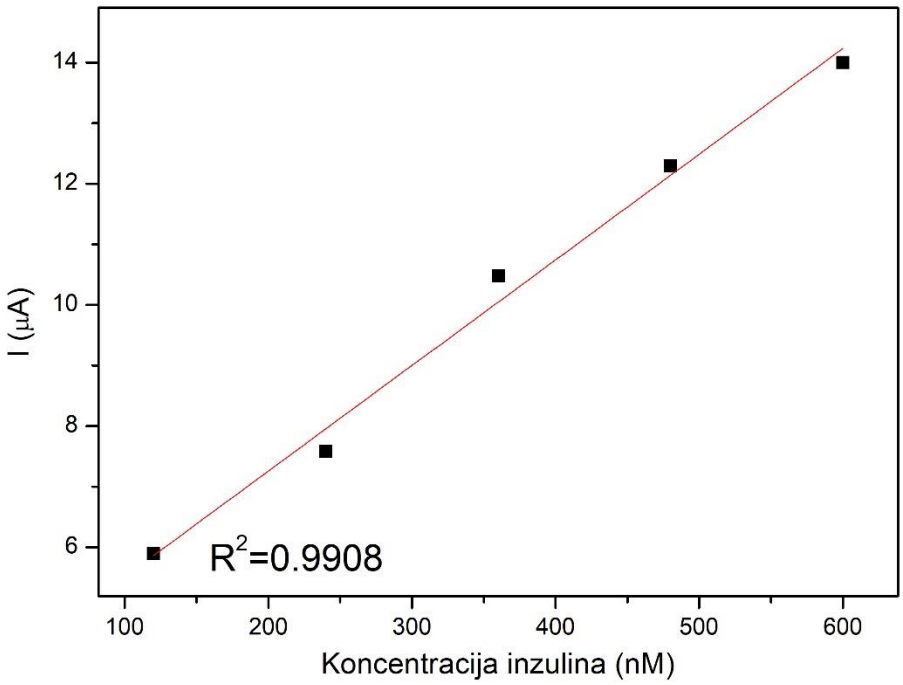
Prethodna dva mjerenja su zatim ponovljena uz razliku da je elektroda za otpuštanje inzulina prije mjerenja neutralizirana no ponovo se ne pojavljuju nikakvi pikovi, odnosno izgleda kao da se inzulin ni na koji način, ni difuzijom, niti elektromodulacijom, ne ispušta iz kompozita.

Konačno je promijenjena mjerna elektroda te je korištena elektroda od staklastog ugljika, tj. troelektrodni sustav u kojemu je elektroda od staklastog ugljika korištena kao radna elektroda, za referentnu elektrodu je korištena Ag/AgCl, a protuelektroda je platinska žica. Elektrode su vidljive na slici 24.



Slika 24. Elektroda od staklastog ugljika, Ag/AgCl elektroda i platinska žica.

S mjernom elektrodom od staklastog ugljika prvo je izvedeno mjerenje za kalibracijski pravac inzulina. U čistu otopinu 10 mL PBS pufera dodavan je alikvot 2 μL inzulina, nakon čega se otopina promiješa magnetskom miješalicom, te se izmjeri odgovarajuća struja. Tako je napravljeno pet točaka i kalibracijski pravac izgleda bolje od svih prethodnih te se može pogledati na slici 25. Čini se kako je elektroda od staklastog ugljika puno stabilnija i pikovi su točno jedan iznad drugoga, bez pomaka potencijala.

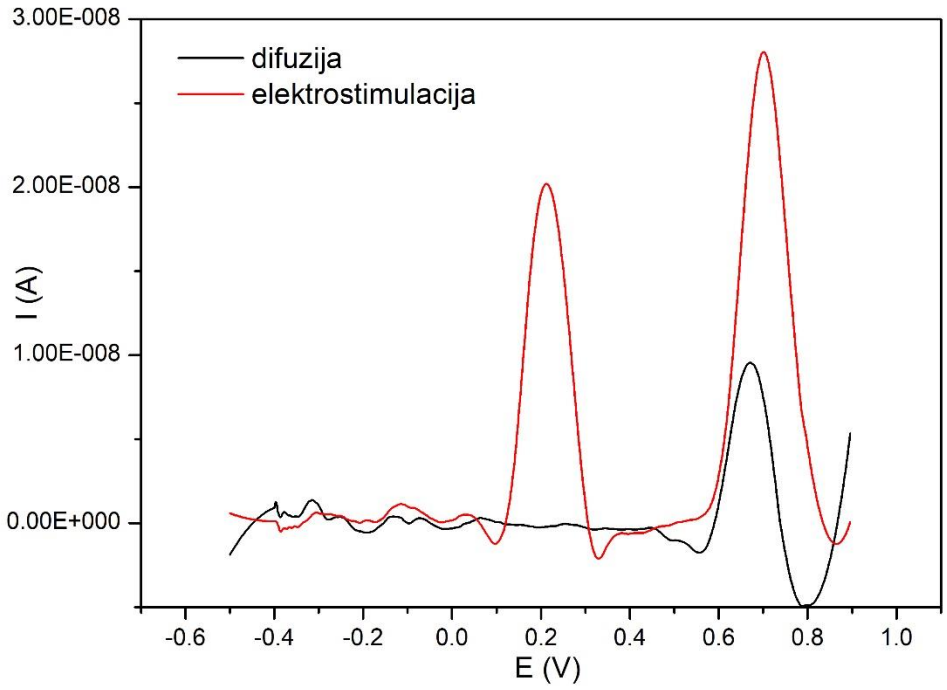


Slika 25. Kalibracijski pravac inzulina s elektrodom od staklastog ugljika kao radnom elektrodom.

Mjerenje otpuštanja inzulina difuzijom rađeno je na način da je u improvizirani Faraday-ev kavez postavljena magnetska miješalica na koju se postavi čaša s 10 mL unaprijed pripremljenog PBS pufera. U nju se prvo uronila samo novo modificirana elektroda s inzulinom. Ostavljena je u puferu 1 h. Nakon toga elektroda je izvađena, otopina je dobro promiješana magnetskom miješalicom. Mjerenje je zatim napravljeno pomoću elektrode od staklastog ugljika. Elektroda od staklastog ugljika je korištena kao radna elektroda, za referentnu elektrodu je korištena Ag/AgCl, a protuelektroda je platinska žica. Mjerenjem se ne vidi nikakav strujni vrh. Elektroda s inzulinom je potom ostavljena još 1 h u puferu i nakon toga je elektroda izvađena, otopina je dobro promiješana i napravljeno još jedno mjerenje te je po prvi put vidljiv mali strujni vrh.

Mjerenje otpuštanja inzulina uz elektromodulaciju izrađeno je na način da je u improvizirani Faraday-ev kavez postavljena magnetska miješalica na koju se postavi čaša s 10 mL unaprijed pripremljenog PBS pufera. U nju se prvo uronila samo novo modificirana elektroda s inzulinom. Primijenjen je potencijal od -0,60 V i ostavljeno 1 h. Nakon toga elektroda je izvađena, otopina je dobro promiješana magnetskom miješalicom. Mjerenje je zatim napravljeno pomoću elektrode od staklastog ugljika. Elektroda od staklastog ugljika

je korištena kao radna elektroda, za referentnu elektrodu je korištena Ag/AgCl, a protuelektroda je platinska žica. Mjerenjem vidljiv je mali strujni vrh. Potom je mjerenje ponovljeno nakon što je elektroda s inzulinom ostavljena još 1 h i vidljivo je kako je cijela bazna linija pobjegla, no računanjem integrala oba pika vidljiv je porast što se može vidjeti na slici 26.



Slika 26. Voltamogrami dobiveni praćenjem otpuštanja inzulina difuzijom (—) i uz elektrostimulaciju(—) u fosfatnom puferu na modificiranoj elektrodi s inzulinom.

5. ZAKLJUČAK

Diabetes mellitus neizlječivi je metabolički poremećaj, okarakteriziran hiperglikemijom, koji se u tijelu razvija kao posljedica nedostatka inzulina, neosjetljivosti organizma na inzulin ili oboje. Dijabetes tipa 2 je puno češći i raširenji, a uzrok mu je kombinacija rezistencije na djelovanje inzulina i neadekvatan kompenzacijski sekretorni odgovor inzulina. Dijabetesu tipa 1 uzrok je apsolutni nedostatak lučenja inzulina. On obuhvaća 5–10% oboljelih od dijabetesa. Proizlazi iz stanično posredovanog autoimunog uništavanja β-stanica gušterača stoga su pacijenti koji boluju od njega obavezni redovno unositi inzulin.

Inzulin je dipeptid koji se sastoji od 51 aminokiseline. Oralna administracija inzulina nije moguća, zbog njegove iznimne degradacije proteazama u gastrointestinalnom traktu, te se inzulin trenutno može davati pacijentu jedino parenteralno odnosno injekcijom ili infuzijom u potkožno tkivo. Takva primjena ima puno mana, a ono najbitnije samom pacijentu je što je primjena bolna i zamorna. U zadnje je vrijeme stoga došlo do razvoja modernih injekcijskih uređaja kao što su inzulinske olovke ili vrlo oštre igle što je uvelike smanjilo bol uboda injekcije i povećalo praktičnost. Iako se teret potkožne primjene inzulina smanjio, i dalje je potrebno rukovanje uređajem (često u javnosti) te je i dalje povezano s boli, iako je ona gotovo zanemariva danas.

Kako bi se baš te dvije najvažnije stavke izbjegle, cilj ovoga diplomskog rada bio je izraditi koncept sustava za kontrolirano otpuštanje inzulina elektromodulacijom kompozitnih filmova kitozan-CNT. Prvo je napravljen i karakteriziran kitozanski hidrogel. Potom je ispitana disperzibilnost CNT pri različitim pH vrijednostima, čiji su rezultati upotrijebljeni za izradu suspenzije s najbolje dispergiranim CNT. Također je unaprijed ispitano koliko inzulin utječe na relativnu viskoznost električni vodljivog hidrogela kao nosača inzulina. Konačno su rezultati svih pojedinačnih eksperimenata upotrijebljeni za izradu kompozitnog filma kitozan-CNT sa zarobljenim inzulinom. Za kontrolirano otpuštanje inzulina upotrijebljeno je nekoliko različitih dizajna kako bi se optimiziralo njegovo otpuštanje.

Otpuštanje inzulina iz kompozitnog filma se radilo paralelno difuzijom i elektromodulacijom, te su rezultati oba eksperimenta uspoređeni. Iz rezultata je vidljivo kako je najbolji način izrade kompozita onaj u kojem se *drop casting* metodom nanese na

elektrodu, te se odmah potom ta kapljica okruži otopinom NaOH koncentracije 0,01 mol/L kako bi se kompozitni film neutralizirao.

Testirano je više dizajna sustava za elektromodulaciju, i u konačnici zaključeno kako je otpuštanje inzulina najbolje kada je kompozitni film nanešen na *screen printed carbon* elektrodu na taj način da je u kontaktu sa dva pola elektrode. Za mjerenje otpuštenog inzulina najbolja se pokazala voltametrija s linearnom promjenom potencijala uz korištenje troelektrodnog sustava u kojemu je elektroda od staklastog ugljika korištena kao radna elektroda, za referentnu elektrodu je korištena Ag/AgCl, a protuelektroda je platinska žica. Potencijal pri kojem je određivana količina otpuštanja inzulina iz kompozita uz elektromodulaciju je -0,60 V.

U konačnici zaključeno je kako je moguće napraviti kontrolirano otpuštanje inzulina elektromodulacijom kompozitnih filmova kitozan-CNT. No, nakon ovoga potrebno je napraviti još puno više eksperimenata kako bi se taj koncept usavršio, zatim optimizirao i možda onda jednoga dana iskoristio kao pomoć pri izradi uređaja koji bi olakšao život brojnim pacijentima oboljelim od dijabetesa tipa 1.

6. LITERATURNA VRELA

[1] Mellitus, Diabetes. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 28.S37 (2005): S5-S10.

[2] Dodson, G., & Steiner, D. (1998). The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Current opinion in structural biology*, *8*(2), 189-194.

[3] Heinemann, L., Pfutzner, A., & Heise, T. (2001). Alternative routes of administration as an approach to improve insulin therapy: update on dermal, oral, nasal and pulmonary insulin delivery. *Current pharmaceutical design*, *7*(14), 1327-1351.

[4] Naficy, S., Razal, J. M., Spinks, G. M., & Wallace, G. G. (2009). Modulated release of dexamethasone from chitosan–carbon nanotube films. *Sensors and Actuators A: Physical*, *155*(1), 120-124.

[5] https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/insulin-medicines-treatments/pancreatic-islet-transplantation (pristup 19.7.2021.)

[6] http://www.endokrinologija-jelcic.com/novosti/dijabetes/ (pristup 19.7.2021.)

[7] Zhang, S., Saito, K., Matsumoto, H., Minagawa, M., & Tanioka, A. (2008). Characterization of insulin adsorption behavior on amphoteric charged membranes. Polymer journal, 40(9), 837-841.

[8] Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein, A., & Blume, G. (1998). Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1368*(2), 201-215.

[9] Tibaldi, J. M. (2012). Evolution of insulin development: focus on key parameters. *Advances in therapy*, *29*(7), 590-619.

[10] Ahmed, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research* 6.2 (2015): 105-121.

[11] Bhattarai, Narayan, Jonathan Gunn, and Miqin Zhang. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 62.1 (2010): 83-99.

[12] Petrovčić, Tomislav, and Ana Pilipović. Hidrogelovi. *Polimeri: časopis za plastiku i gumu* 32.1 (2011): 31-33.

[13] Ullah, Faheem, et al. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering*: C 57 (2015): 414-433.

[14] Gibas, Iwona, and Helena Janik. Synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. (2010).

[15] Qiu, Yong, and Kinam Park. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 53.3 (2001): 321-339.

[16] Cong, Huai-Ping, Ping Wang, and Shu-Hong Yu. Stretchable and self-healing graphene oxide–polymer composite hydrogels: a dual-network design. *Chemistry of Materials* 25.16 (2013): 3357-3362.

[17] Hoare, T. R., & Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer,* 49(8), 1993-2007.

[18] Murdan, S. (2003). Electro-responsive drug delivery from hydrogels. *Journal of controlled release*, 92(1-2), 1-17.

[19] Sawahata, K., Hara, M., Yasunaga, H., & Osada, Y. (1990). Electrically controlled drug delivery system using polyelectrolyte gels. *Journal of Controlled Release*, 14(3), 253-262.

[20] Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, S. M., & Amoozgar, Z. (2015). Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in pharmaceutical sciences*, 10(1), 1.

[21] https://www.nanowerk.com/nanotechnology/introduction/introduction_to_nanotechnology_22.php (pristup: 10.09. 2021.)

[22] Pandey, P., & Dahiya, M. (2016). Carbon nanotubes: Types, methods of preparation and applications. *Carbon NY*, *1*(4).

[23] Martínez-Hernández, A. L., Velasco-Santos, C., & Castano, V. (2010). Carbon nanotubes composites: processing, grafting and mechanical and thermal properties. *Current Nanoscience*, *6*(1), 12-39.

[24] Hirlekar, R., Yamagar, M., Garse, H., Vij, M., & Kadam, V. (2009). Carbon nanotubes and its applications: a review. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, *2*(4), 17-27.

[25] Misra, A. (2014). Carbon nanotubes and graphene-based chemical sensors. *Current Science*, 419-429.

[26] Galano, A. (2010). Carbon nanotubes: promising agents against free radicals. *Nanoscale*, *2*(3), 373-380.

[27]Ravnjak, G. (2020). Kovalentna funkcionalizacija ugljičnih nanocijevi (Doctoral dissertation, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Department of Chemistry).

[28] Thaha, Y. N. (2018). Synthesis and electrochemical applications of boron-and phosphorus-doped carbon nanotubes (Doctoral dissertation, Technische Universität Ilmenau).

[29] Yan, J., Wang, H., Wu, T., Li, X., & Ding, Z. (2014). Elastic and electrically conductive carbon nanotubes/chitosan composites with lamellar structure. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *67*, 1-7.

[30] Razal, J. M., Gilmore, K. J., & Wallace, G. G. (2008). Carbon nanotube biofiber formation in a polymer-free coagulation bath. *Advanced Functional Materials*, *18*(1), 61-66.

[31] Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R., & Rocha, J. (2002). An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(1-3), 1-8.

[32] Khodaverdi, E., Tafaghodi, M., Ganji, F., Abnoos, K., & Naghizadeh, H. (2012). In vitro insulin release from thermosensitive chitosan hydrogel. *Aaps Pharmscitech*, *13*(2), 460-466.

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime i prezime	Klaudija Janić
Datum i mjesto rođenja	01.07.1996. Rijeka
Adresa	Vrbik 15, 32000 Vukovar
e-mail	klaudija.janic9696@gmail.com
Obrazovanje	
2019. – 2021.	**Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer** Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2015. – 2019.	**Preddiplomski sveučilišni studij kemije** Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek Završni rad: Metode mjerenja koncentracije glukoze u krvi Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
2011. – 2015.	**Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku, Osijek**
2011. – 2015.	**Glazbena škola Franje Kuhača, Osijek** Glazbenica klaviristica
Aktivnosti i sudjelovanja	
svibanj 2021.	Festival znanosti

	Predstavljanje Odjela za kemiju - radionica - predavanje: Analiza boja umjetničkih djela
studeni 2019.	23. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Predstavljanje Odjela za kemiju - radionica
Osobne vještine	
Materinski jezik	Hrvatski jezik
Strani jezici	Engleski jezik – aktivno u govoru i pismu Njemački jezik – pasivno u govoru i pismu
Vozačka dozvola	B kategorija
Računalne vještine	MS Office sustav, služenje internetom i mailom