



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Diplomsko delo

**ZASNOVA IN ANALIZA NOVIH POLIMERNIH OBLOG Z
VGRAJENIMI ZDRAVILNIMI UČINKOVINAMI NA
ZLITINI TITAN/ALUMINIJ/VANADIJ**

september, 2018

Manca Merslavič



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Manca Merslavič

**Zasnova in analiza novih polimernih oblog z
vgrajenimi zdravilnimi učinkovinami na zlitini
titan/aluminij/vanadij**

Diplomsko delo

Maribor, 2018



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Zasnova in analiza novih polimernih oblog z vgrajenimi zdravilnimi učinkovinami na zlitini titan/aluminij/vanadij

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje

Študent: Manca Merslavič
Študijski program: univerzitetni študijski program I. stopnje Kemija
Predvideni strokovni naslov: diplomirani/a kemik/kemičarka (UN)
Mentor: doc. dr. Matjaž Finšgar
Somentor: doc. dr. Uroš Maver

Maribor, 2018



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Številka: K1012237/1

Datum: 02.10.2017

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Statut UM–UPB 12, Uradni list RS, št. 29/2017) izdajam:

SKLEP O ZAKLJUČNEM DELU

Manca Merslavič, študent-u/-ki univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje KEMIJA, se dovoljuje izdelati zaključno delo.

Mentor/-ica: doc. dr. Matjaž Finšgar

Somentor/-ica: doc. dr. Uroš Maver

Naslov zaključnega dela:

ZASNOVA IN ANALIZA NOVIH POLIMERNIH OBLOG Z VGRAJENIMI ZDRAVILNIMI UČINKOVINAMI NA ZLITINI TITAN/ALUMINIJ/VANADIJ

Naslov zaključnega dela v angleškem jeziku:

DEVELOPMENT AND ANALYSIS OF NOVEL POLYMERIC COATINGS WITH INTEGRATED PHARMACEUTICAL SUBSTANCES ON TITANIUM/ALUMINIUM/VANADIUM ALLOY

Rok za izdelavo in oddajo zaključnega dela je 30.09.2018. Zaključno delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo zaključnega dela« in ga v treh izvodih oddati v pristojnem referatu članice. Hkrati se odda tudi izjava mentor-ja/-ice in morebitne/-ga somentor-ja/-ice o ustreznosti zaključnega dela.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na Senat članice v roku 10 delovnih dni od dneva prejema sklepa.

DEKAN

red. prof. dr. Zdravko Kravanja

Obvestiti:

- kandidat-a/-ko,
- mentor-ja/-ico,
- somentor-ja/-ico,
- odložiti v arhiv



FAKULTETA ZA KEMIJO IN
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Kazalo

Kazalo	I
Izjava.....	II
Zahvala	III
Povzetek.....	IV
Abstract.....	V
Seznam tabel.....	VI
Seznam slik.....	VII
Uporabljeni simboli in kratice	VIII
1 Uvod.....	1
2 Pregled literature	3
2.1 Predstavitev zlitin Ti/Al/V	3
2.2 Nesteroidne protivnetne učinkovine (NSAID)	4
2.3 Diklofenak.....	4
3 Teoretični del.....	6
3.1 Validacija analizne metode	6
3.1.1 Meja zaznavnosti	6
3.1.2 Meja določljivosti	6
3.1.3 Občutljivost.....	6
3.1.4 Linearnost metode	6
3.1.5 Ubežniki – uporaba Grubbsovega ali Dixonovega testa.....	7
3.2 Metode dela.....	7
3.2.1 Metoda mikroskopije na atomsko silo.....	7
3.2.2 Ultravijolična spektroskopija.....	9
3.2.3 Infrardeča spektroskopija oslavljenega totalnega odboja	10
3.3 Predstavitev aparaturne opreme.....	11
3.3.1 Brušenje	11
3.3.2 Oblaganje.....	11
3.3.3 ATR-FTIR spektroskopija	13
3.3.4 <i>In vitro</i> testiranje sproščanja.....	14
3.3.5 Kvantifikacija sproščanja.....	15
4 Eksperimentalni del.....	16
4.1 Predstavitev uporabljenih kemikalij	16
4.2 Priprava vzorcev in raztopin	16
4.3 Priprava tankih slojev	17
5 Rezultati in diskusija	19
5.1 Karakterizacija priprave vzorcev	19
5.2 Študija sproščanja <i>in vitro</i>	20
5.2.1 Koncentracija sproščanja DCF v odvisnosti od časa.....	21
5.2.2 Kumulativna masa sproščenega DCF v odvisnosti od časa.....	22
5.2.3 Količina sproščenega DCF v odvisnosti od časa.....	23
5.3 Analiza površine pripravljenih vzorcev	25
5.4 Spektrofotometrična metoda	26
6 Zaključek.....	27
7 Literatura	28

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala sama. Pregledala sem literaturo s področja diplomskega dela po naslednjih geslih:

Vir: ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>)

Gesla:	Število referenc
Ti90/Al6/V4	2
Ti/Al/V alloy and diclofenac	51
Multilayer coatings and in vitro release	2,852

Vir: COBISS/OPAC (<http://www.cobiss.si/scripts/cobiss?ukaz=getid>, COBIB.SI)

Gesla:	Število referenc
Diklofenak in in vitro sproščanje	1
Zlitine titana/aluminija/vanadija	2
Večslojne obloge	4

Skupno število pregledanih člankov: 10

Skupno število pregledanih knjig: 2

Maribor, september 2018

Manca Merslavič

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju, doc. dr. Matjažu Finšgarju in somentorju, doc. dr. Urošu Mavru, za strokovno pomoč, nasvete ter usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem vsem sodelavcem Inštituta za biomedicinske vede za pomoč pri eksperimentalnem delu.

Posebno zahvalo pa izrekam svoji družini za vso podporo in vzpodbudo tekom študija.

Zasnova in analiza novih polimernih oblog z vgrajenimi zdravilnimi učinkovinami na zlitini titan/aluminij/vanadij

Povzetek

V diplomskem delu je predstavljena zasnova in analiza novih polimernih oblog, ki imajo vgrajene zdravilne učinkovine na zlitini Ti90/Al6/V4. Namen zasnove polimernih oblog je njihova potencialna uporaba v ortopedske (protetični implantati – kolena, umetni kolki, ipd.) in zobozdravstvene namene. S pomočjo študije oblaganja vzorcev, karakterizacije tankih filmov in testiranja *in vitro* sproščanja, želimo spoznati možnost uporabe te zlitine v ortopedski medicini, kjer bi se zdravilna učinkovina sproščala neposredno na določeno mesto in tako zagotovila ciljano sproščanje te učinkovine, prav tako pa bi bolniku pomagala pri okrevanju po operativnem posegu. Vgrajena zdravilna učinkovina sodi v skupino nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAID). Rezultati študije karakterizacije vzorcev so pokazali prisotnost dveh glavnih komponent, to sta diklofenak in mešanica polimerov, kar smo potrdili s karakterizacijo tankih filmov z ATR-FTIR metodo (infrardeča spektroskopija oslabiljenega totalnega odboja), rezultati *in vitro* sproščanja pa so potrdili, da sproščanje zdravilne učinkovine vselej poteka po istem mehanizmu, in sicer v treh stopnjah: zelo hitro sproščanje, hitro sproščanje in zelo počasno sproščanje. Pritrdimo lahko, da se največ zdravilne učinkovine sprosti v prvih 360 minutah, kar prispeva k ciljanem odmerjanju le-te.

Ključne besede: zlitina titan/aluminij/vanadij, večslojne obloge, diklofenak, oblaganje z vrtenjem, *in vitro* sproščanje

UDK: 66.095.26:669.715(043.2)

Development and analysis of novel polymeric coatings with integrated pharmaceutical substances on titanium/aluminium/vanadium alloy

Abstract

This bachelor thesis presents the design and analysis of new polymer coatings with integrated active substances on Ti90/Al6/V4 alloy. These polymer coatings have the potential for being used in orthopedic (prosthetic implants – artificial hips, knees, elbows, etc.) and dental purposes. With the help of case study on coating substrates, characterisation of thin films and testing *in vitro* release, we want to determine whether it is possible to use such materials in orthopedic medicine, where the active substance would be released directly onto specified location and thus ensure a targeted release of the substance and further also help a patient recover after surgical procedure. Integrated active substance belongs to the group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). Results of the study on characterization of thin films showed presence of two main components: diclofenac and a mixture of polymers, which were confirmed with the characterization of thin films by ATR-FTIR (angl. *attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy*) method. The results of *in vitro* release state that the release of the active substance always takes place in the same mechanism in three stages: very fast release, fast release and very slow release. In conclusion, most of the active substance releases in the first 360 minutes, which contributes to targeted dosing.

Key words: titanium/aluminium/vanadium alloy, multilayer coatings, diclofenac, spin coating, *in vitro* release

UDK: 66.095.26:669.715(043.2)

Seznam tabel

Tabela 4-1 Optimalni parametri za pripravo tankih slojev	17
--	----

Seznam slik

Slika 2-1 Vzorci zlitine Ti90/Al6/V4 pripravljene za oblaganje	3
Slika 2-2 Strukturna formula DCF	5
Slika 3-1 Shematski prikaz delovanja AFM	8
Slika 3-2 Naprava za UV-VIS spektrometrijo	9
Slika 3-3 Naprava za brušenje SAPHIR 320	11
Slika 3-4 Naprava za oblaganje POLOS SPIN 150i	12
Slika 3-5 Naprava za snemanje ATR-FTIR spektrov	13
Slika 3-6 Naprava za in vitro testiranje sproščanja	14
Slika 3-7 Notranjost UV-VIS spektrofotometra	15
Slika 4-1 Nanašanje zdravilne učinkovine na substrat	18
Slika 4-2 Ustrezno označeni obloženi vzorci v mikrotitrski ploščici	18
Slika 5-1 ATR-FTIR spekter izmenično obloženih slojev POLI in DCF	19
Slika 5-2 Celice za in vitro testiranje sproščanja	20
Slika 5-3 Koncentracija sproščenega DCF v času	21
Slika 5-4 Kumulativna masa in odvod kumulativne mase sproščenega DCF v času	22
Slika 5-5 Masni delež in odvod masnega deleža sproščenega DCF v času	24
Slika 5-6 Površina obloženih vzorcev 3POLY2DCF in 3POLY3DCF izmerjena z AFM	25
Slika 5-7 Umeritvena krivulja s 95- in 90-odstotnim intervalom zaupanja	26

Uporabljeni simboli in kratice

Simboli

Al	aluminij
G	kritične vrednosti Grubbsovega testa
H_0	ničelna hipoteza
Mo	molibden
Nb	niobij
Q	kritične vrednosti Dixonovega testa
Ti	titan
V	vanadij
W	wolfram

Kratice

AFM	mikroskopija na atomsko silo
ATR-FTIR	tehnika infrardeče spektroskopije na oslabljen totalni odboj
CaSiO ₃	kalcijev silikat (volastonit)
COX	ciklooksigenaza
DCF	diklofenak
HAp	hidroksiapatit
Hz	herz
IR	infrardeče območje spektra elektromagnetnega valovanja
LOQ	meja določljivosti
NaDOC	natrijev deoksilat
NSAID	nesteroidne protivnetne učinkovine
PBS	raztopina fosfatnega pufra
PHEMA	polihidroksietil metakrilat
PHPMA	polihidroksipropil metakrilat
POLI	mešanica polimerov PHEMA, PHPMA in NaDOC
QC	koeficient kvalitete
STM	vrstična tunelska mikroskopija
UV-VIS	ultravijolična vidna spektrofotometrija

1 Uvod

Ortopedski in zobni vsadki so bili desetletja uspešno uporabljani z namenom zamenjati ali popraviti manjkajoče oziroma poškodovane kosti, sklepe in zobe, da bi obnovili njihovo funkcijo po bolezni ali poškodbi pacienta. Čeprav je stopnja uspeha teh vsadkov na splošno visoka, so rezultati bolnika včasih ogroženi zaradi težav povezanih z napravo, kot so nezadostna vgrajenost, lokalno vnetje ali okužbe tkiva.

Veliko različnih vrst površinskih prevlek je že bilo razvitih za odpravo teh pomanjkljivosti, vključno s tistimi, ki vsebujejo terapevtska sredstva, ki bi zagotavljala lokalno dostavo na točno določeno mesto.

Medtem ko imajo te prevleke ogromen potencial za izboljšanje funkcije samih vsadkov, je seznam zahtev, ki jih idealna kombinacija prevleke mora izpolniti, obsežen, in niti en sistem prevlek dandanes hkrati ne izpolnjuje vseh meril. Nekateri glavni izzivi, povezani s trenutnimi prevlekami, so kinetika neoptimalnega sproščanja, katera je najpogosteje prehitra, visoka občutljivost za mehansko obrabo, toksičnost, težke in drage regulatorne odobritvene poti ter visoki proizvodni stroški [1].

Zamenjava kolka je eden najpogostejših ortopedskih postopkov na pacienta v skupini nad 60 let, s povprečno letno rastjo več kot 25 % med letoma 2000 in 2009 [2].

Najpogosteje uporabljana zdravila v postoperativnem obdobju so nesteroidna protivnetna zdravila (NSAID). Imajo izrazito moč analgetika, protivnetni efekt in manj stranskih učinkov v primerjavi z opioidi. Nesteroidna protivnetna zdravila in preventivna radioterapija lahko celo prepreči ektopično formacijo kosti okoli boka po totalni artroplastiji kolka [3].

Uspeh ortopedskih vsadkov je odvisen od močne pritrditve naprave na skeletno tkivo. Titanova zlitina Ti90/Al6/V4 se pogosto uporablja kot ortopedski in zobni vsadek, zahvaljujoč odlični biokompatibilnosti, vključno z nizko toksičnostjo in odpornostjo proti koroziji.

Vendar pa odziv pacientov na zlitino Ti90/Al6/V4 ni vedno zadovoljujoč, kajti le-ta lahko tvori vlaknast sloj na vmesnem tkivu, kar povzroča aseptično razrahljanje naprave. Zato je potreba po razvoju novih inženirskih površin, da bi zagotovili boljše biološke rezultate, visoka.

Z namenom izboljšanja diferenciacije kosti ter zagotavljanja direktnega stika med kostjo in implantatom, so bile izvedene razne spremembe na površini zlitine titan/aluminij/vanadij.

Ena izmed teh modifikacij je oblaganje zlitine Ti90/Al6/V4 z bioaktivnimi keramikami, npr. hidroksiapatit (HAp) in CaSiO_3 . Vendar pa je velika pomanjkljivost HAp premazov v tem, da ne ohranijo dolgoročne stabilnosti in v določenih primerih lahko pride do razslojevanja oblog HAp od zlitine, to pa zaradi njihovih šibkih vezi in nezadostne kemijske stabilnosti.

Za razliko od HAp premazov so obloge CaSiO_3 prispevale k dobri bioaktivnosti in izboljšale kratkoročne oseointegracijske lastnosti (angl. *osseointegration properties*) implantata, a je njihova nadaljna uporaba zaradi slabe kemijske stabilnosti vprašljiva [4].

Zaradi zgoraj navedenih razlogov še dandanes poskušajo razviti nove bioaktivne prevleke za uporabo na zlitinah titan/aluminij/vanadij, da bi odpravili pomanjkljivosti predhodno uporabljenih oblog.

2 Pregled literature

2.1 Predstavitev zlitin Ti/Al/V

Gama titanovi aluminidi (TiAl) so vzbudili velik interes za raziskave pri visokotemperaturnih aplikacijah zaradi njihove teže v kombinaciji z odličnimi lastnostmi pri visokih temperaturah, kot sta lezenje in oksidacijska odpornost. Poleg tega v celoti lamelarne Ti/Al zlitine, sestavljene iz TiAl in majhne količine Ti_3Al , kažejo izredno lomno žilavost. Vendar pa jih je njihova slaba lastnost – duktilnost – ovirala pri uporabi na področjih letalske, vesoljske in avtomobilske industrije.

V zadnjem času so nove zlitine TiAl, ki vsebujejo manj aluminija in nekaj več beta stabilizatorjev, kot so Mo, Nb, W ali V, vedno bolj popularne, saj imajo večji raztezek pri sobni temperaturi in so tudi bolj obstojne [5].

V svoji diplomski nalogi sem uporabila žarjeno zlitino titana, aluminija, vanadija (Ti90/Al6/V4), debeline 1,0 mm, proizvajalca Goodfellow (Cambridge, VB), kot je prikazano na sliki 2-1.



Slika 2-1 Vzorci zlitine Ti90/Al6/V4 pripravljene za oblaganje

2.2 Nesteroidne protivnetne učinkovine (NSAID)

Prostaglandini so družina hormonov, ki jih proizvajajo celice telesa in imajo več pomembnih funkcij. Spodbujajo vnetje, ki je nujno za zdravljenje, hkrati pa povzročajo bolečino in povišano telesno temperaturo. Podpirajo funkcijo krvnih strdkov trombocitov in ščitijo želodčno oblogo pred škodljivimi učinki kisline.

Prostaglandini nastanejo v telesnih celicah preko encima ciklooksigenaza (COX). Obstajata dva COX encima, COX-1 in COX-2, ki proizvajata prostaglandine, le-ti pa spodbujajo vnetje, bolečino in vročico. Vendar pa samo COX-1 proizvaja prostaglandine, ki podpirajo trombocite in ščitijo želodec.

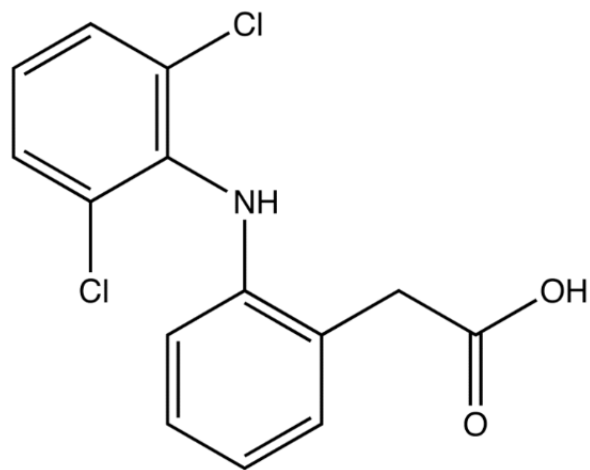
Nesteroidna protivnetna zdravila (NSAID) blokirajo encime COX in zmanjšujejo tvorbo prostaglandinov v celem telesu. Posledično se zmanjšajo vnetja, bolečine in povišana telesna temperatura. Vendar zaradi prostaglandinov, ki ščitijo želodec in podpirajo trombocite ter zmanjšujejo strjevanje krvi, lahko nesteroidna protivnetna zdravila povzročajo razjede na želodcu in spodbujajo krvavitve [6].

2.3 Diklofenak

Diklofenak (DCF, prikazan na sliki 2-2) spada v družino nesteroidnih protivnetnih zdravil in je derivat fenilocetne kisline. Deluje tako, da znižuje koncentracijo snovi v telesu, ki povzročajo bolečino in vnetje. V primerih potencialnega osteoartritisa ali revmatoidnega artritisa se uporablja za namene lajšanja bolečine, pod imenom Cataflam (angl. *diclofenac potassium immediate-release tablets*) pa se uporablja tudi za lajšanje menstrualnih krčev [7].

DCF pa ima tako kot večina ostalih zdravil tudi sam nekaj neželenih stranskih učinkov:

- prebavne motnje, bolečine v trebuhu, slabost,
- zaprtje, diareja,
- srbečica, prekomerno znojenje,
- povišan krvni tlak,
- boleče in otekle okončine.



Slika 2-2 Strukturna formula DCF

3 Teoretični del

3.1 Validacija analizne metode

Validacija je postopek, kjer s statističnimi parametri ovrednotimo ustreznost določene analizne metodologije.

V svoji diplomski nalogi sem določala ubežnike z uporabo Grubbsovega in Dixonovega testa, linearnost spektrofotometrične metode, mejo zaznavnosti in mejo določljivosti.

3.1.1 Meja zaznavnosti

Meja zaznavnosti je najmanjša množina analita, ki jo uspemo razlikovati od meritve slepega vzorca (angl. *blank sample*) [8].

3.1.2 Meja določljivosti

Meja določljivosti (LOQ, angl. *limit of quantification*) ali limita kvantifikacije je definirana kot spodnja meja kvantitativne meritve [8].

3.1.3 Občutljivost

Izraz občutljivost se najpogosteje uporablja kot kalibracijska občutljivost oziroma sprememba signala na spremembo enote koncentracije analita (naklon kalibracijske krivulje). V kolikor je kalibracijska krivulja linearna, je občutljivost konstantna in neodvisna od koncentracije. Če pa je kalibracijska krivulja nelinearna, se občutljivost spreminja s koncentracijo [8].

3.1.4 Linearnost metode

Linearnost analitske metode predstavlja koncentracijsko območje, v katerem lahko določamo analit z linearno kalibracijsko krivuljo. Najpogosteje jo ovrednotimo z regresijsko premico na podlagi postopka najmanjših kvadratov. Metoda se smatra za linearno, v kolikor je kvadrat koeficienta korelacije R^2 vsaj 0,99. Linearnost metode se lahko preverja tudi s koeficientom kvalitete QC (angl. *quality coefficient*). Bolje kot se eksperimentalne točke ujemajo s prilagojeno krivuljo, manjši je QC [8].

3.1.5 Ubežniki – uporaba Grubbsovega ali Dixonovega testa

Vse n vrednosti x_i v vzorcu moramo urediti po velikosti od najmanjšega x_1 do največjega x_{maks} . Ničelna hipoteza H_0 pravi: testirana vrednost je ubežnik. Z uporabo Grubbsovega in Dixonovega testa torej potrdimo ali ovržemo ničelno hipotezo H_0 : Če je $G^{meritve} > G^{tabele} \rightarrow$ je meritev ubežnik, oziroma $Q^{meritve} > Q^{tabele} \rightarrow$ meritev je ubežnik. Kritične vrednosti Dixonovega testa označujemo s Q , Grubbsovega testa pa z G [8].

3.2 Metode dela

3.2.1 Metoda mikroskopije na atomsko silo

Tehniko mikroskopije na atomsko silo - AFM (angl. *atomic force microscopy*) so leta 1986 odkrili Binning, Quate in Gerber z namenom, da bi premostili pomanjkljivosti svojega predhodnika, vrstičnega tunelskega mikroskopa (STM, angl. *scanning tunneling microscopy*) [9].

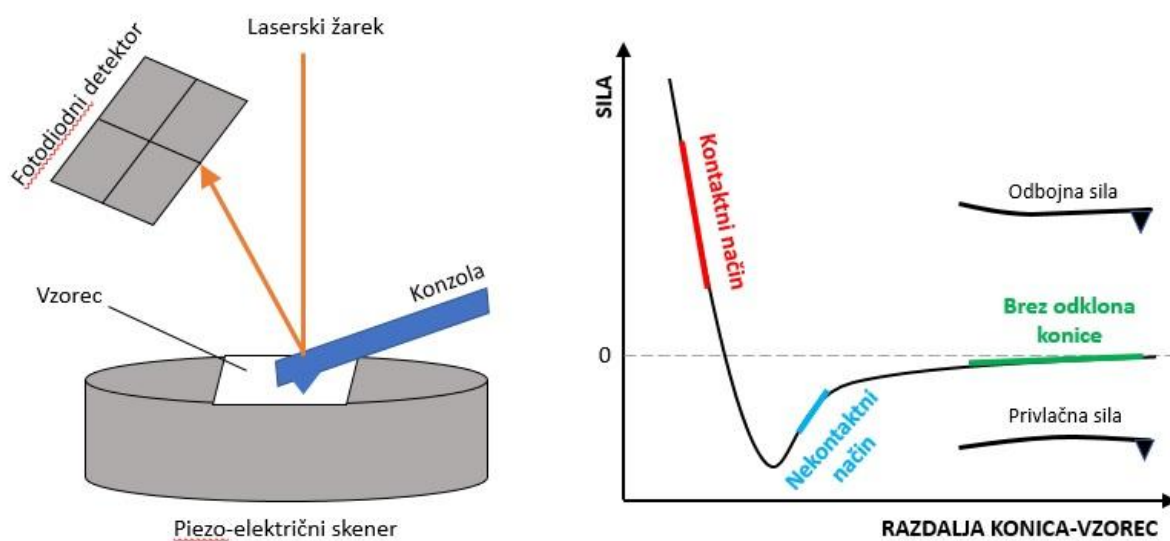
Glavna razlika med AFM in STM je, da z AFM namesto tunelskega toka merimo silo med površino vzorca in konico tipala. Način, po katerem deluje AFM (prikazan na sliki 3-1), je osnovan na merjenju odboja laserske svetlobe od površine tipala, ki se zaradi vpliva različnih sil premika med vzorcem, in vrhom konice tipala. Odbito lasersko svetlobo zaznamo s fotodiodo ter merimo tako vertikalni kot tudi lateralni premik konice tipala.

Sile merjene z AFM so naslednje: van der Waalsove, elektrostatske, magnetne, kapilarne, ionske, odbojne sile, itd. Vzorci, ki jih analiziramo z AFM, morajo biti v atmosferskih razmerah, tj. v vakuumu ali v tekočini, pri različnih temperaturah. Metoda AFM je uporabna za analize topografije površin snovi in sprememb na površini, katere povzročijo različni procesi: abrazija, adhezija, korozija, trenje, jedkanje, poliranje, itd.

Zaradi izjemne občutljivosti na premike mora biti mikroskop dobro zaščiten pred mehanskimi vibracijami različnih frekvenc od 10 Hz do nekaj kHz. Dušenje mehanskih vibracij običajno dosežemo s postavitvijo mikroskopa na granitni blok, katerega obesimo na strop z elastičnimi vrvmi. Za dodatno izboljšanje stabilnosti mikroskopa je mogoče dobiti tudi posebej narejene podstavke z vgrajenim mehansko-elektronskim dušenjem vibracij.

Glavni deli mikroskopa na atomsko silo so piezoelektrični nosilec vzorca ali tipala – skener, tipalo s konico in ročico, laserski svetlobni sistem s fotodiodo za merjenje odklona tipala in nadzorna elektronika z računalnikom [10].

Morfologijo površine in hrapavost vzorcev z različnim končnim slojem v oblogi smo ovrednotili z mikroskopom na atomsko silo Keysight Technologies AFM 7500 (Agilent, Santa Barbara, ZDA). Za meritve smo uporabili t. i. način »merjenja z dinamično silo« (angl. *tapping mode*). Meritve smo izvedli s pomočjo silikonskih konic (ATEC-NC-20, Nanosensors, Germany) s frekvenco resonance 210-490 kHz in konstanto sile $12\text{-}110\text{ N m}^{-1}$. Meritve smo izvajali pri sobni temperaturi. Vsem vzorcem smo izmerili slike velikosti $20 \times 20\ \mu\text{m}$ z ločljivostjo 512×512 pikselov (Mohan et al., 2014). Na koncu smo slike še obdelali, in sicer s pomočjo prosto dostopnega programa Gwyddion.



Slika 3-1 Shematski prikaz delovanja AFM

3.2.2 Ultravijolična spektroskopija

Fotoni UV in vidne svetlobe z valovnimi dolžinami med 180 in 780 nm imajo dovolj veliko energijo, da v molekulah povzročijo prehod elektronov iz osnovnih energijskih nivojev v višje energijske nivoje. Pri tem nastanejo zelo kratkoživa vzbujena stanja molekul, nato pa se elektroni vrnejo nazaj v osnovno stanje. Ravno zaradi elektronskih prehodov in prisotnosti določenih skupin imenovanih kromoforji (beseda kromofor izhaja iz grščine in pomeni nosilec barve), ki olajšajo prehode, vidimo nekatere spojine obarvane. Za take spojine so značilni obsežni konjugirani sistemi dvojnih ($C=C$, $C=O$, $N=N$) in trojnih ($C\equiv C$) vezi [11].

UV-VIS spektrometrijo izvajamo z aparaturo prikazano na sliki 3-2.



Slika 3-2 Naprava za UV-VIS spektrometrijo

3.2.3 Infrardeča spektroskopija oslabiljenega totalnega odboja

ATR FTIR-spektroskopija (angl. *attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy*) deluje na osnovi merjenja sprememb, ki se pojavijo na odbojnem IR žarku, ko le-ta pride v stik z vzorcem. Žarek IR je usmerjen na optično gosti kristal z visokim lomnim količnikom pod določenim kotom. Ta odbojnost ustvarja evanescentni val, ki sega skozi površino kristala na vzorec, ki je v stiku s kristalom.

V področjih IR spektra, kjer vzorec absorbira energijo, bo evanescentni val oslabiljen. Atenuirani žarek se odbije od kristala, nato pa izstopi iz nasprotnega konca kristala in se usmeri na detektor v IR-spektrometru. Graf intenzitete svetlobe v odvisnosti od razlike optične poti žarkov imenujemo interferogram. Spektre vzorca nato dobimo s Fourierovo transformacijo interferograma.

Trdne snovi, primerne za ATR, vključujejo homogene trdne vzorce, površinsko plast večplastne trdne snovi ali prevleko na trdni snovi. Tudi drugače oblikovane trdne snovi lahko analiziramo s trdim kristalom ATR, kot je diamant.

Poleg tega je ATR pogosto prednostna metoda za analizo tekočin, ker zahteva preprosto namestitev kapljice tekočine na kristal.

Lastnosti, ki najbolj odlikujejo to metodo pa so:

- minimalna priprava vzorca – položimo majhno količino vzorca na kristal,
- hitro in enostavno čiščenje – preprosto odstranimo vzorec in očistimo površino kristala,
- analiza vzorcev v njihovih naravnih stanjih – ni potrebe po segrevanju, pritisku na pelete ali mletju za zbiranje spektrov,
- odlična za debelejše vzorce (površinska plast ne sme biti pretanka) [12].

Do leta 1950 so vsi instrumenti za detekcijo absorpcije IR svetlobe uporabljali disperzijske spektrometre. Dandanes so jih nadomestili spektrometri FTIR, saj imajo poleg cenovne ugodnosti še veliko drugih prednosti pred disperzijskimi interferometri. Med pomembnimi prednostmi metode FTIR je zagotovo visoko razmerje med absorpcijskim signalom vzorca in šumom. Zaradi visokega razmerja signal/šum je mogoče izmeriti spekter že zelo majhnim količinam snovi [13].

3.3 Predstavitev aparatur

3.3.1 Brušenje

Za brušenje zlitine titan/aluminij/vanadij smo uporabljali napravo SAPHIR 320 – prikazana na sliki 3-3 (ATM, Nemčija), ki je namenjena brušenju vzorcev. Naprava sestoji iz vrteče se plošče premera od 25 do 30 cm, katero lahko odstranimo za lažji dostop pri čiščenju, in cevke, katera omogoča dovod vode za mokro brušenje. Pretok vode smo ročno nastavili na pipi. Prav tako naprava omogoča dva nivoja hitrosti. Prvo, ki dopušča lažje manevriranje z vzorcem, saj je hitrost brušenja počasnejša, in drugo, ki zagotavlja hitrejše brušenje. Za pripravo vzorcev smo se posluževali različno grobih brusnih papirjev.



Slika 3-3 Naprava za brušenje SAPHIR 320

3.3.2 Oblaganje

Pri oblaganju vzorcev nam je bila v pomoč naprava POLOS SPIN 150i – prikazana na sliki 3-4 (SPS-Europe B. V., Nizozemska), ki zaradi svoje uporabnosti in zmožnosti oblaganja manjših vzorcev (premer od 5 do 160 mm) služi za čiščenje, sušenje in oblaganje vzorcev. Zgrajena je iz naravnega polipropilena (PP) ter ima transparentni pokrov z držalom za iglo, namenjeno za nanos v središče. Ponuja tudi elektro-magnetno varnostno ključavnico,

snemljivo kontrolno ploščo in večji zaslon, ki je občutljiv na dotik in omogoča enostavno programiranje po korakih.

Omogoča tudi shranjevanje postopkov z več stopnjami za:

- smer vrtenja: levo / desno,
- hitrost vrtenja: od 0 obr. min⁻¹ do 12 000 obr. min⁻¹,
- čas: od 0,1 s stopnja⁻¹ do 99999 s stopnja⁻¹,
- pospešek / zaviranje: od 1 obr. min⁻¹ s⁻¹ do 30 000 obr. min⁻¹ s⁻¹,
- vakuumski prises na držalo vzorca: vključeno / izključeno [14].



Slika 3-4 Naprava za oblaganje POLOS SPIN 150i

3.3.3 ATR-FTIR spektroskopija

Naprava za ATR-FTIR spektroskopijo, ki je prikazana na sliki 3-5, zaradi tesnega stika med preiskovanim substratom, kot so tanki filmi in ATR kristalom (v našem primeru diamant) omogoča merjenje spektrov. ATR-FTIR spektre smo izmerili z Agilent Cary 630 FTIR spektrometrom (Agilent, ZDA) z diamantnim kristalom, katerega območje merjenja zajema valovne dolžine od 4000 do 650 cm^{-1} . Postopek meritev naših vzorcev je vključeval predhodno čiščenje kristala, namestitvev nosilca s slojem obrnjenim navzdol in fiksiranje nosilca s tulcem. Naprava je nato izmerila prepustnost infrardeče svetlobe s pomočjo programa MicroLab PC 4.0 (Agilent, ZDA). Ta je izrisal graf s prepustnostjo na y-osi in valovnim številom na x-osi, katerega smo zatem še preoblikovali v OriginPro 8.5 (OriginLab, Velika Britanija).

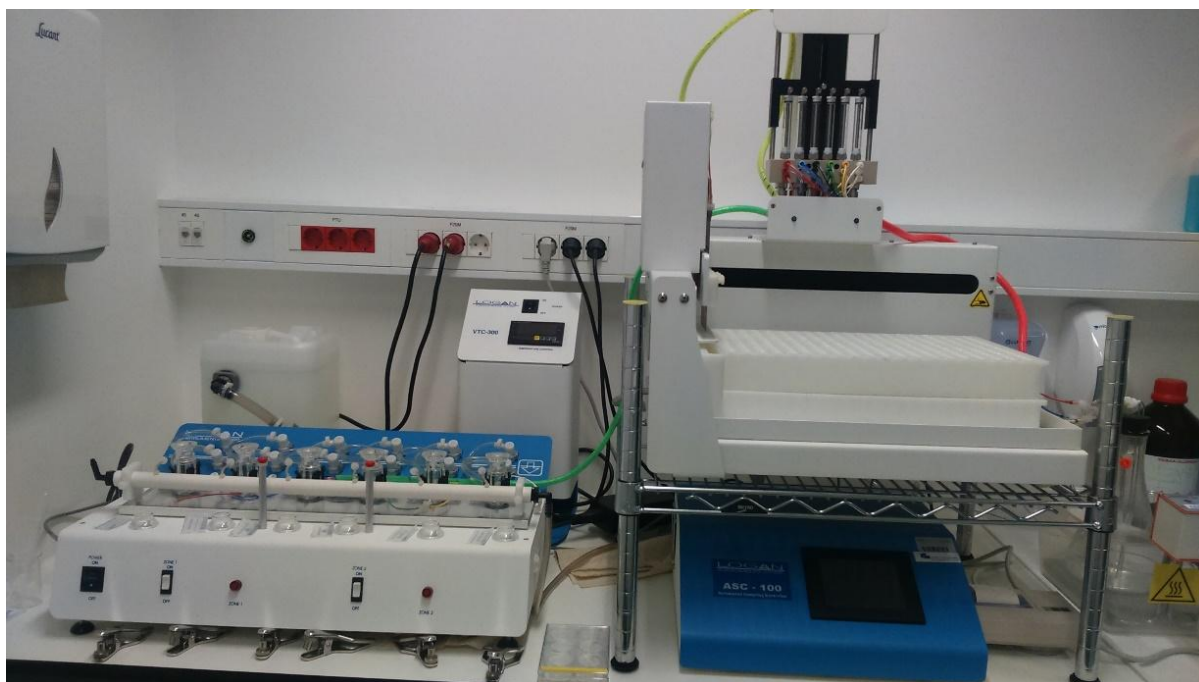


Slika 3-5 Naprava za snemanje ATR-FTIR spektrov

3.3.4 *In vitro* testiranje sproščanja

Za merjenje *in vitro* sproščanja učinkovin smo uporabili avtomatiziran sistem Francovih difuzijskih celic (angl. *automated transdermal diffusion cells sampling system*), proizvajalca Logan System 912-6, Somerset, ZDA, prikazan na sliki 3-6 [15].

Vzorci z zdravilno učinkovino smo počasi in previdno spustili v Francove difuzijske celice. Sprejemni del celice je bil napolnjen s fosfatno pufrsko raztopino – PBS (Sigma-Aldrich, Nemčija). PBS sestoji iz 0,01 M fosfatnega pufra, 0,0027 M KCl in 0,137 M NaCl, pH 7,4, pri 25 °C. Temperaturo sprejemnega dela celice smo držali konstantno na 37 °C, da je bil sistem čimbolj podoben človeškemu. Med testiranjem raztapljanja smo medij mešali z magnetnim mešalom s številom 50 obratov/min pod Francovo difuzijsko celico. Vzorce smo odzemali v različnih časovnih intervalih znotraj 24 ur (1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, 360 min in 1440 min). Nadalje pa smo sproščeno vsebnost diklofenaka v sprejemnem mediju izmerili z UV-VIS spektrofotometrijo.



Slika 3-6 Naprava za *in vitro* testiranje sproščanja

3.3.5 Kvantifikacija sproščanja

Koncentracijo DCF, raztopljeno v sprejemnem mediju, smo izmerili z UV-VIS spektrometrom, ki ga prikazuje slika 3-7, (Cary 60 UV-Visible Spectrophotometer, Agilent, Nemčija) pri 276 nm. Za izračun koncentracije smo uporabljali Beer-Lambertov zakon, s pomočjo katerega lahko iz izmerjene absorbance določimo koncentracijo raztopljenega DCF. Meritve sproščanja smo opravili na vseh vzorcih, prvič na 5 slojnih in drugič na 6 slojnih, v časovnem intervalu vse od 1 minute pa do 24 ur.



Slika 3-7 Notranjost UV-VIS spektrofotometra

4 Eksperimentalni del

4.1 Predstavitev uporabljenih kemikalij

Pri eksperimentalnem delu diplomske naloge smo se posluževali sledečih kemikalij:

- Polihidroksietil metakrilat (PHEMA, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- Polihidroksipropil metakrilat (PHPMA, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- Natrijev deoksilat (NaDOC, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- Ultra čista voda (prevodnost 18,2 M Ω cm pri 25 °C, ELGA PureLab water purification system, Veolia Water Technologies UK),
- Ultra čista voda – Mili-Q®; Milipore Corporation, Massachusetts, ZDA (upornost 18,2 M Ω cm pri 25 °C),
- Etanol – Carlo Erba Reagents, Milano, Italija (95 %, $M = 58,44 \text{ g mol}^{-1}$),
- DCF – C₁₄H₁₀Cl₂NNaO₂ – Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA ($\geq 98,5$ %, $M = 318,13 \text{ g mol}^{-1}$),
- PBS – raztopina fosfatnega pufra – Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA (pH 7,4 pri 25 °C),
- SiC brusni papir – Struers, Ballerup, Danska (zrnatost: 300 zrn in⁻¹, 500 zrn in⁻¹, 800 zrn in⁻¹, 1200 zrn in⁻¹, 2400 zrn in⁻¹).

4.2 Priprava vzorcev in raztopin

Za eksperimentalni del smo pripravili štiri raztopine, in sicer prva raztopina je bila mešanica 1 ut. % PHEMA, 0,1 ut. % PHPMA ter 1 ut. % NaDOC. PHEMA smo pripravili v EtOH v koncentraciji 10 mg/mL, PHPMA smo pripravili v ultra čisti vodi v koncentraciji 1 mg/mL, NaDOC pa smo pripravili v koncentraciji 10 mg/mL v ultra čisti vodi. DCF je bil pripravljen kot 1 ut. % raztopina s koncentracijo 10 mg/mL.

Priprava vzorcev se je začela z brušenjem na vrteči brusilni napravi z uporabo brusilnega papirja iz SiC (Struers, Ballerup, Danska) pod curkom vode. Pričeli smo z brušenjem vzorcev v eni smeri, dokler niso bile odpravljene vse nepravilnosti na površini in so bile na vzorcu vidne le raze v eni smeri. Za zmanjšanje abrazije smo morali vzorec med brušenjem vsaj štirikrat obrniti za 90°. Ko so bile odpravljene nepravilnosti na vseh vzorcih in so bile površine lepo zglajene, smo vzorce očistili v ultrazvočni kopeli – 5 minut v 50 vol. %

raztopini ultra čiste vode in 50 vol. % etanola. Zatem smo vzorce sprali z ultra čisto vodo ter jih posušili s curkom komprimiranega zraka. Tako pripravljene vzorce smo nato uporabili kot substrat za izmenično nanašanje slojev raztopin polimera in DCF.

4.3 Priprava tankih slojev

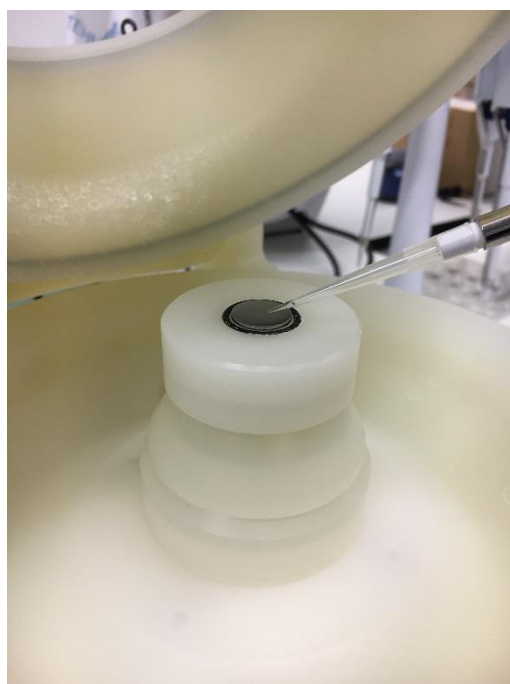
Tanke sloje smo izdelali z uporabo naprave »spin coater« po metodi oblaganja (POLOS, SPIN 150i, SPS, GmbH, Nemčija). Postopek izdelave le-teh je potekal v več stopnjah. Kot prvo smo s pinceto prenesli naš substrat na vrtečo se ploščo in ga položili čimbolj v sredino, saj se je v tem primeru raztopina po substratu lepše in bolj enakomerno razporedila. Pod površino vrteče se plošče je bila nameščena odprtina za vakuum, katerega vrednost je morala biti ob vklopu čim nižja, tj. pod 35 kPa. Nato smo s pipeto odpipetirali 50 μ L raztopine in jo vbrizgali na površino substrata, vendar smo pri tem morali paziti, da se s konico nastavka, kateri je bil pritrjen na avtomatsko pipeto, nismo dotaknili površine substrata, saj bi jo lahko poškodovali oz. na njej pustili manjše vreznine (postopek prikazan na sliki 4-1). Napravo smo zatem zaprli z dviznim pokrovom in v programu nastavili načrt, ki je zajemal število posameznih faz, hitrost vrtenja, ipd., s katerim smo želeli doseči točno določen učinek porazdelitve raztopine po površini substrata. Po oblaganju smo vzorce prenesli v mikrotitrne ploščice P12 za namene nadaljne uporabe, kot je razvidno iz slike 4-2.

V spodnji tabeli so prikazani optimalni parametri za dvostopenjsko pripravo tankih slojev z izbranimi raztopinami, katerih smo se tudi sami posluževali.

Tabela 4-1 Optimalni parametri za pripravo tankih slojev

#	Parametri	Stopnja 1	Stopnja 2
1	Hitrost vrtenja (RPM, angl. <i>rotations per minute</i>)	1500	2500
2	Pospešek vrtenja (RPM/s)	1000	1000
3	Čas vrtenja	50	30
4	Volumen kapljice (μ L)	50/100	

* Za vsak sloj je bilo potrebno izvesti obe stopnji. V imenih vzorcev je razvidno število posameznih kapljic oz. slojev.



Slika 4-1 Nanašanje zdravilne učinkovine na substrat



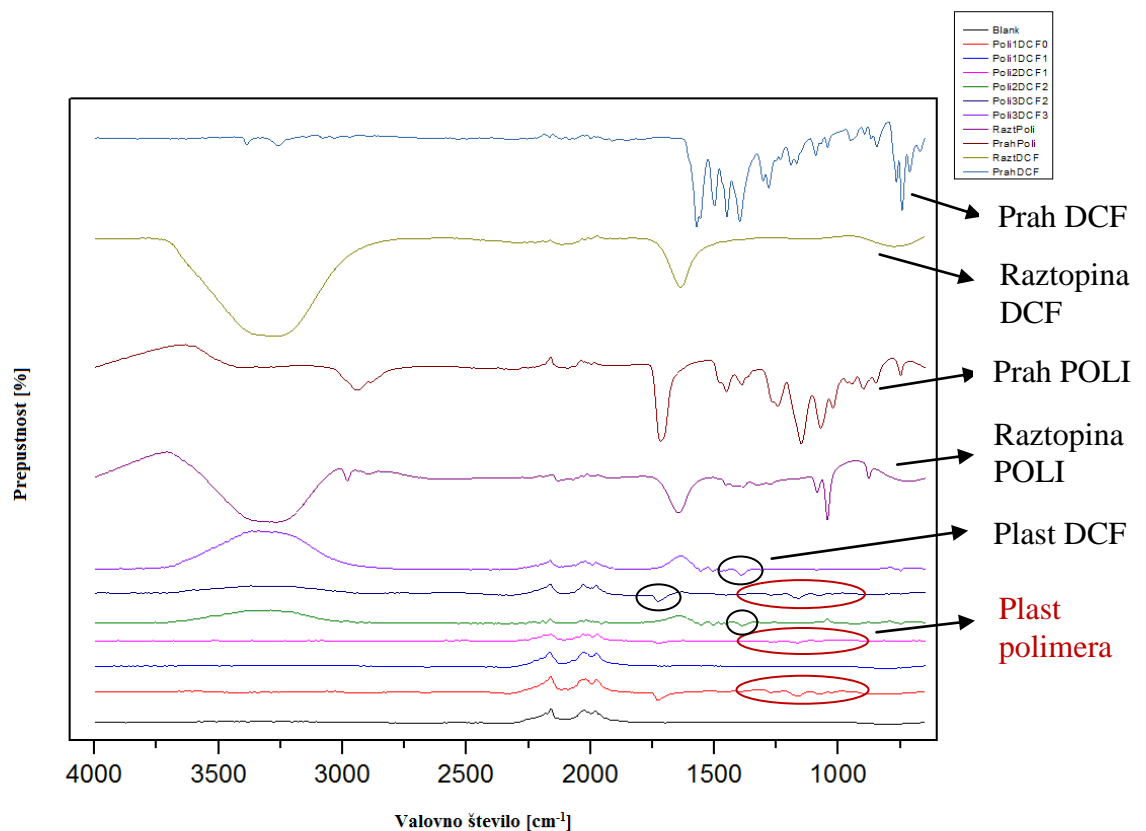
Slika 4-2 Ustrezno označeni obloženi vzorci v mikrotitrski ploščici

5 Rezultati in diskusija

5.1 Karakterizacija priprave vzorcev

Namen diplomske naloge je bil pripraviti novo, biokompatibilno večslojno prevleko iz polimera (POLI) in DCF na substratu Ti90/Al6/V4, katera bi v stiku z medijem delovala protivnetno, hkrati pa bi pospešila rast kostnih celic. Z namenom zagotoviti, da se na substrat nanese dovolj zdravilne učinkovine za željen učinek zdravljenja, smo izbrali večslojni mehanizem, hkrati pa zagotovili podaljšano in nadzorovano sproščanje DCF. Slednje ima velik pomen, saj lahko le na ta način preprečimo potencialno lokalno predoziranje, katerega posledice so potencialne poškodbe tkiva. Podaljšano sproščanje pa je pomembno predvsem pri zagotavljanju sproščanja zdravilne učinkovine v določenem časovnem obdobju, za katerim je varno nadaljevati s sistemsko terapijo.

Večslojno prevleko smo dokazali z uporabo metode ATR-FTIR po pripravi posameznega sloja prevleke. Spekter ATR-FTIR posameznih slojev je prikazan na sliki 5-1.



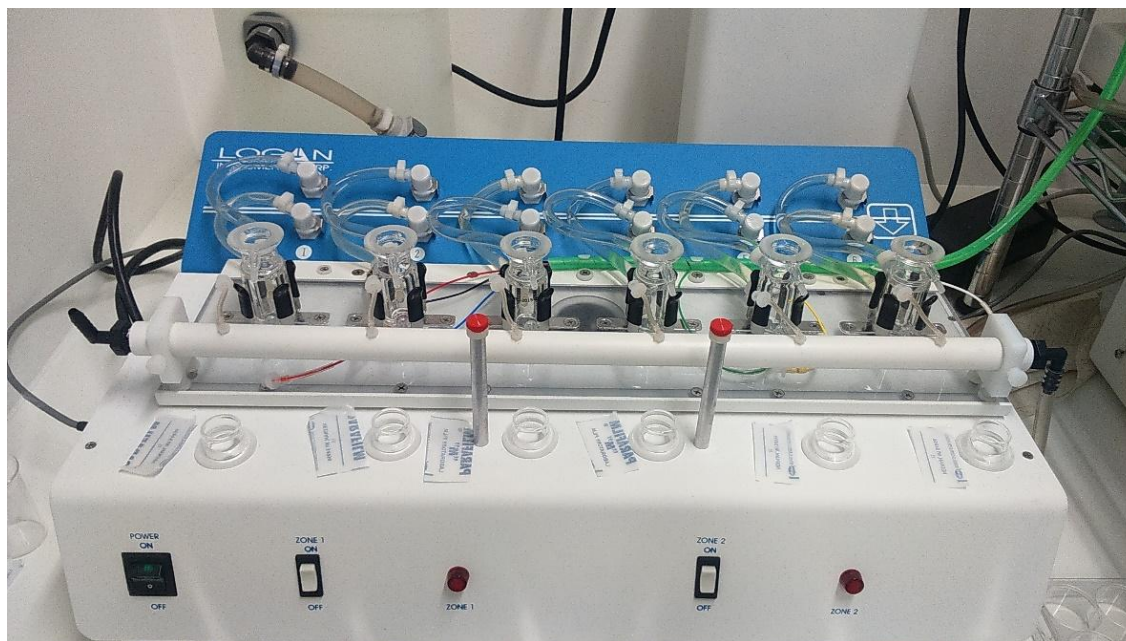
Slika 5-1 ATR-FTIR spekter izmenično obloženih slojev POLI in DCF

Iz spektra lahko vidimo, da se plast DCF začne pojavljati šele na zeleni krivulji, tj. POLI2DCF2 (označeno s črno), ko sta bili na substrat nanešeni že dve plasti DCF. Vzrok, da plast DCF ni vidna že prej, je lahko v tem, da je bilo na substrat nanešeno premalo DCF, ali da se le-ta ni dobro oprijel površine substrata. Možno je tudi, da je bila količina DCF pod mejo zaznavnosti. Plast POLI na spektru pa je vidna že od samega začetka, kar kaže na dobro vezavo na površini substrata. Prav tako je moč razbrati, da se intenziteta vrhov DCF viša z dodanim slojem le-tega, inteziteta vrhov POLI pa je od začetka nekoliko slabša, nato se z vsakim dodanim slojem DCF malce poveča, kar si lahko razlagamo tako, da je prisotnost DCF vplivala na intenziteto vrhov POLI.

Vsekakor lahko potrdimo, da je bila karakterizacija tankih filmov uspešna, saj iz zgornjega spektra vidimo izmenično ponavljanje značilnih vrhov tako za POLI kot tudi za DCF.

5.2 Študija sproščanja *in vitro*

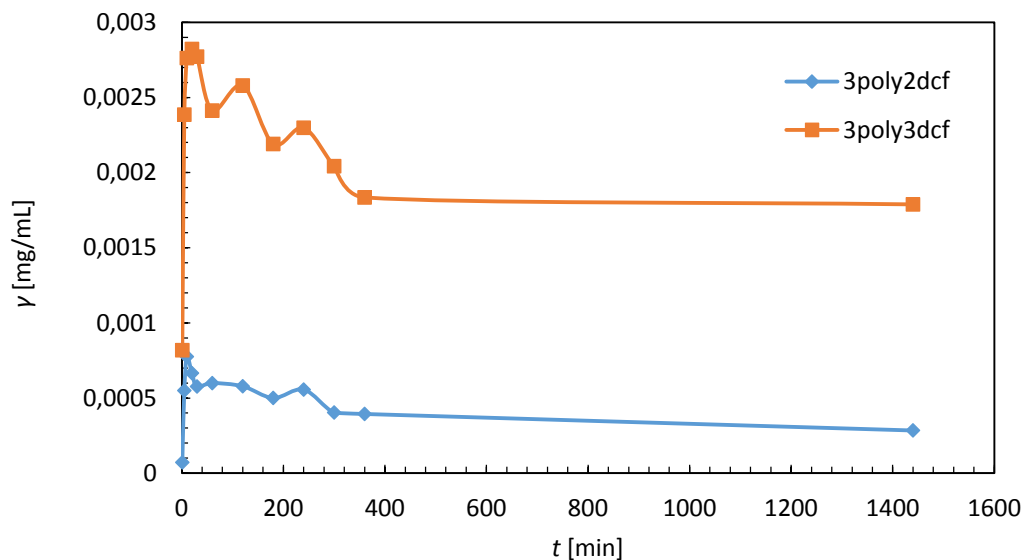
Pomembnejši namen analize je bil ugotoviti način sproščanja te učinkovine v sistemu, ki simulira dogajanje v človeškem telesu. Celice za *in vitro* testiranje sproščanja so prikazane na sliki 5-2.



Slika 5-2 Celice za *in vitro* testiranje sproščanja

5.2.1 Koncentracija sproščanja DCF v odvisnosti od časa

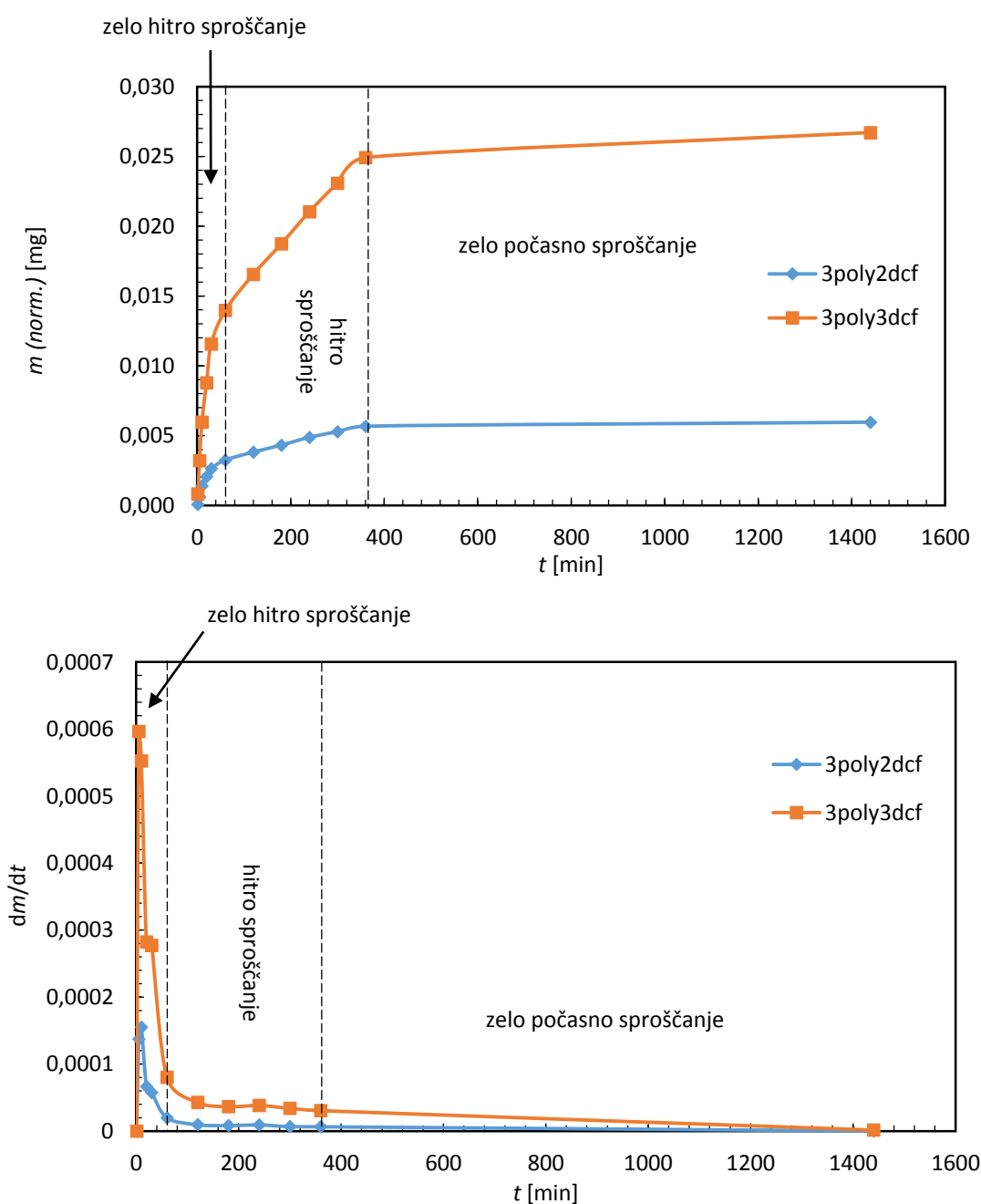
Rezultati spremembe koncentracije v odvisnosti od časa med *in vitro* testiranjem sproščanja so prikazani na sliki 5-3. V začetnih 360 minutah je moč zaznati precejšnje nihanje koncentracije sproščenega DCF. Takšno nihanje v koncentraciji sproščenega DCF je najverjetneje odvisno od števila nanešenih plasti le-tega. Iz spodnjega grafa lahko sklepamo, da se DCF, ki je v neposrednem stiku z medijem sprosti zelo hitro, hkrati pa se pričenjajo sproščati tudi manjše količine učinkovine iz nižjih plasti, kar pripomore k dodatnemu in posledično hitrejšemu sproščanju v začetnem delu krivulje. Ko preteče 360 minut, se 90 % zgornje plasti DCF raztopi v mediju in tedaj se mu izpostavi plast mešanice polimerov (PHEMA, PHPMA in NaDOC), ki je do tedaj učinkovala kot prepreka spodnjim plastem DCF. Ko se raztopi še sedaj izpostavljen sloj mešanice polimerov (obstaja tudi možnost, da odstopi), stopi v stik z raztopino naslednja plast DCF. Proces se vrši vse dokler ni raztopljena zadnja plast DCF. Iz grafa lahko vidimo, da je količina sproščenega DCF v petslojnem sistemu (3POLY2DCF) na celotnem območju manjša, kar je razumljivo, glede na to, da je šeststojni sistem bogatejši za eno plast DCF.



Slika 5-3 Koncentracija sproščenega DCF v času

5.2.2 Kumulativna masa sproščene DCF v odvisnosti od časa

Z izračunom kumulativne mase sproščene DCF, ki je prikazana na sliki 5-4 (zgornji graf), lahko predstavimo pomembno ugotovitev, in sicer, da z dodanim slojem DCF na prejšnji sloj POLI vplivamo na zvišanje količine sproščene DCF, ne da bi v veliki meri vplivali na celotno kinetiko sproščanja, kar je razvidno iz razlike naklonov krivulj v časovnem intervalu od 60 min do 360 min.



Slika 5-4 Kumulativna masa in odvod kumulativne mase sproščene DCF v času

Z odvodom kumulativne mase sproščenega DCF (prikazan na sliki 5-4, spodnji graf) ovrednotimo hitrost sproščanja. Pri tem je iz grafa razvidno, da kinetika sproščanja pri obeh vzorcih sledi podobnemu mehanizmu in tako lahko sproščanje razdelimo na tri področja. Kot že zgoraj omenjeno, je prvo področje, od začetka sproščanja do 60 minut, imenovano področje zelo hitrega sproščanja, saj v grafu kumulativne mase sproščanje ponazarja logaritemska krivulja, prav tako pa lahko v grafu odvoda kumulativne mase zaznamo vrh. Sledi mu področje hitrega sproščanja, od 60 min do 360 min, v katerem se hitrost nekoliko upočasni in je sorazmerno enakomerna, kar potrjuje linearni naklon na grafu kumulativne mase in vodoraven potek krivulje na grafu odvoda. Zadnje področje je področje zelo počasnega sproščanja, kjer je le-to tako majhno, da ga skoraj več ni moč zaznati. To na grafu kumulativne mase prikazuje lepo vidni plato, odvod pa je zanemarljivo majhen, praktično ničelen.

5.2.3 Količina sproščenega DCF v odvisnosti od časa

V zadnjem delu študije *in vitro* sproščanja smo izračunali masni delež sproščenega DCF in njegov odvod v odvisnosti od časa, katera sta prikazana na sliki 5-5. Na podlagi njiju lahko zaključimo, da v prvih šestdesetih minutah sproščanje poteka zelo hitro, kar pomeni, da se v prvih 60 minutah sprosti največ DCF, nato krivulja ni več tako strma, hitrost sproščanja se rahlo upočasni, s tem tudi količina sproščenega DCF, zadnji stadij pa poteka od 360 minute dalje, kjer sproščanje poteka izjemno počasi, količina sproščenega DCF pa je posledično najmanjša.

Izračun masnega deleža sproščenega DCF je prikazan v enačbi 5.1.

$$w = \frac{m_{x, norm.}}{m_{maks, norm.}} \times 100 \quad (5.1)$$

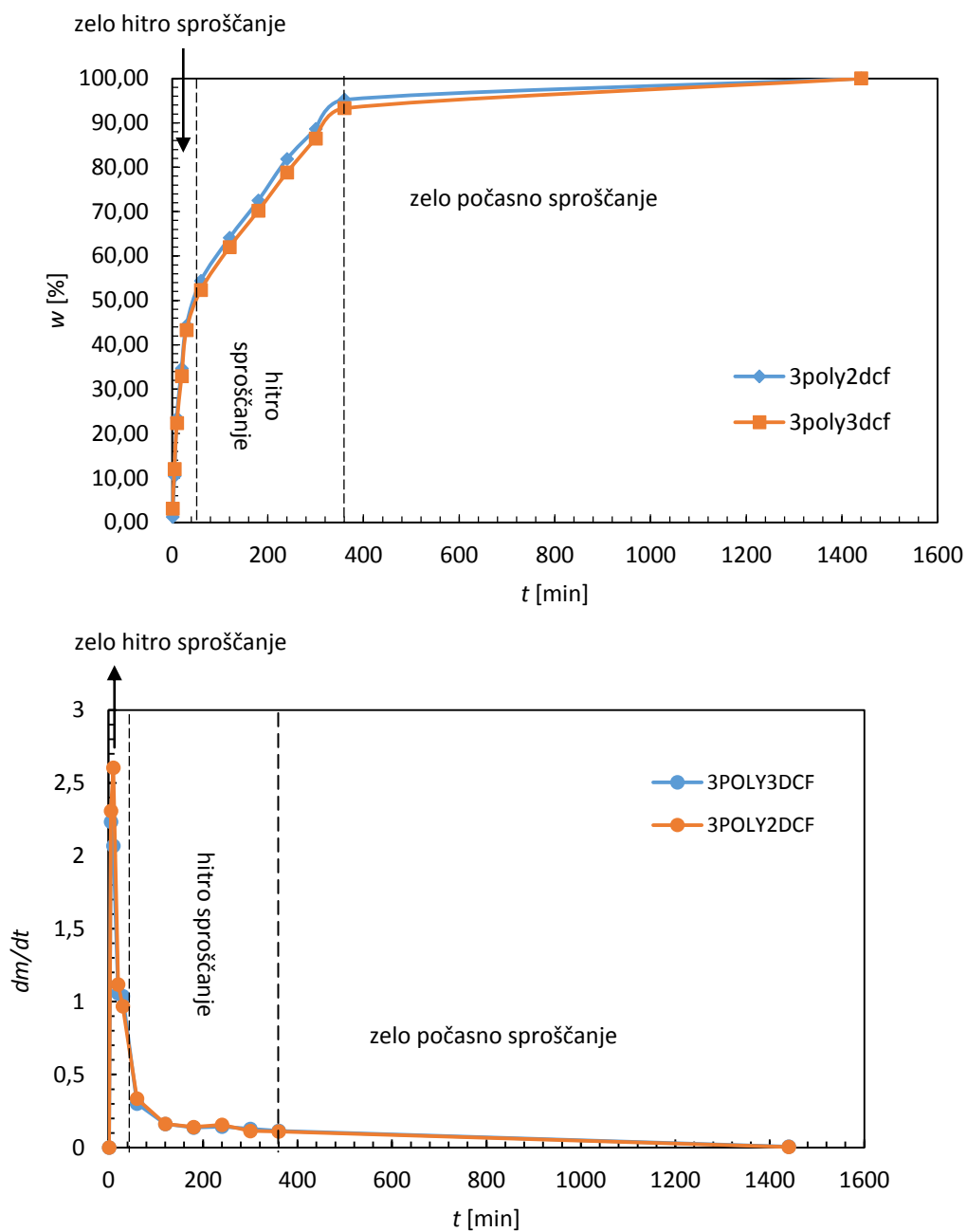
kjer je:

$m_{x, norm.}$ normalizirana masa komponente x (mg)

$m_{maks, norm.}$ maksimalna normalizirana masa (mg)

Normalizirana masa komponente x pa je vsota predhodno izračunanih povprečnih mas, tj.

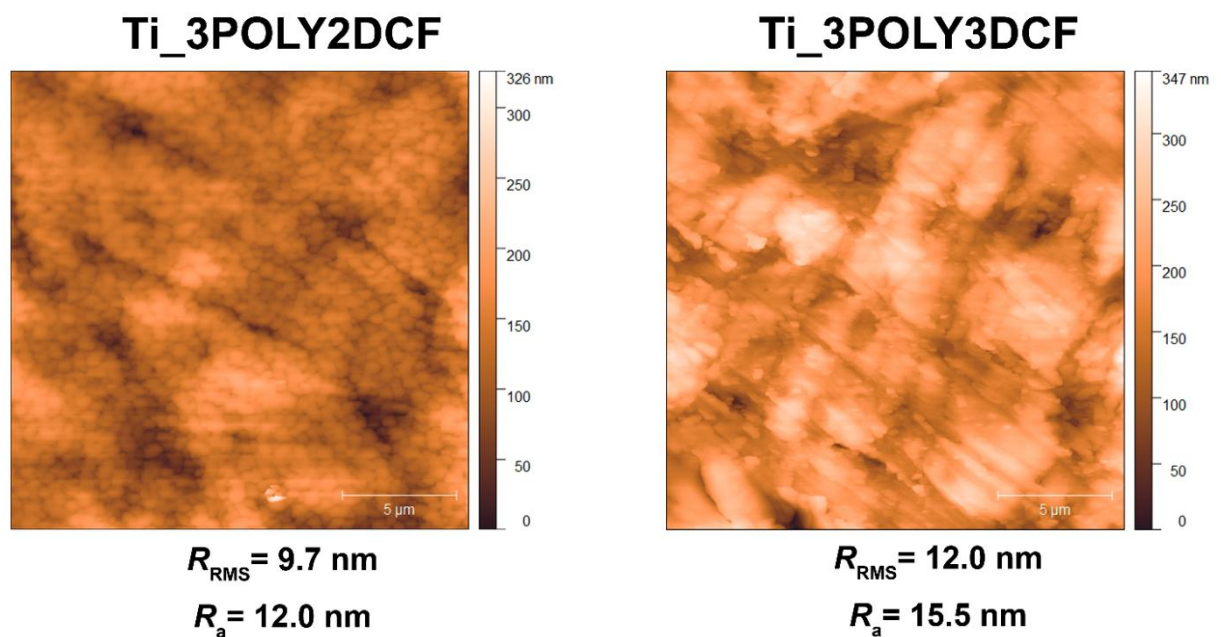
$m_{povp.,n}, n = 1, 2, \dots, x.$



Slika 5-5 Masni delež in odvod masnega deleža sproščenega DCF v času

5.3 Analiza površine pripravljenih vzorcev

Za dodatno analizo površine pripravljenih vzorcev smo slednjo pregledali tudi morfološko in določili dva osnovna parametra hrapavosti (slika 5-6), R_{RMS} in R_a . Oba parametra sta dokaj primerljiva, kar je presenetljivo, saj njuni površini izgledata precej drugače. Medtem ko izgleda površina vzorca, kjer je polimer zadnji sloj (3POLY2DCF), kot da je sestavljena iz posameznih kroglic, je površina vzorca, kjer je na vrhu DCF (3POLY3DCF), bolj nagubana in nabrazdana. Slednje bi lahko nakazovalo na to, da je vsaj del učinkovine na površini prisoten v kristalni obliki. Ključna informacija, ki smo jo dobili s pomočjo mikroskopije pa je v povezavi s homogenostjo nanosa. Obloga namreč enakomerno prekriva vso površino, tako da sam substrat ni viden nikjer, kar je pomembna informacija v povezavi z aplikacijo pripravljenih oblog v biomedicinske namene.

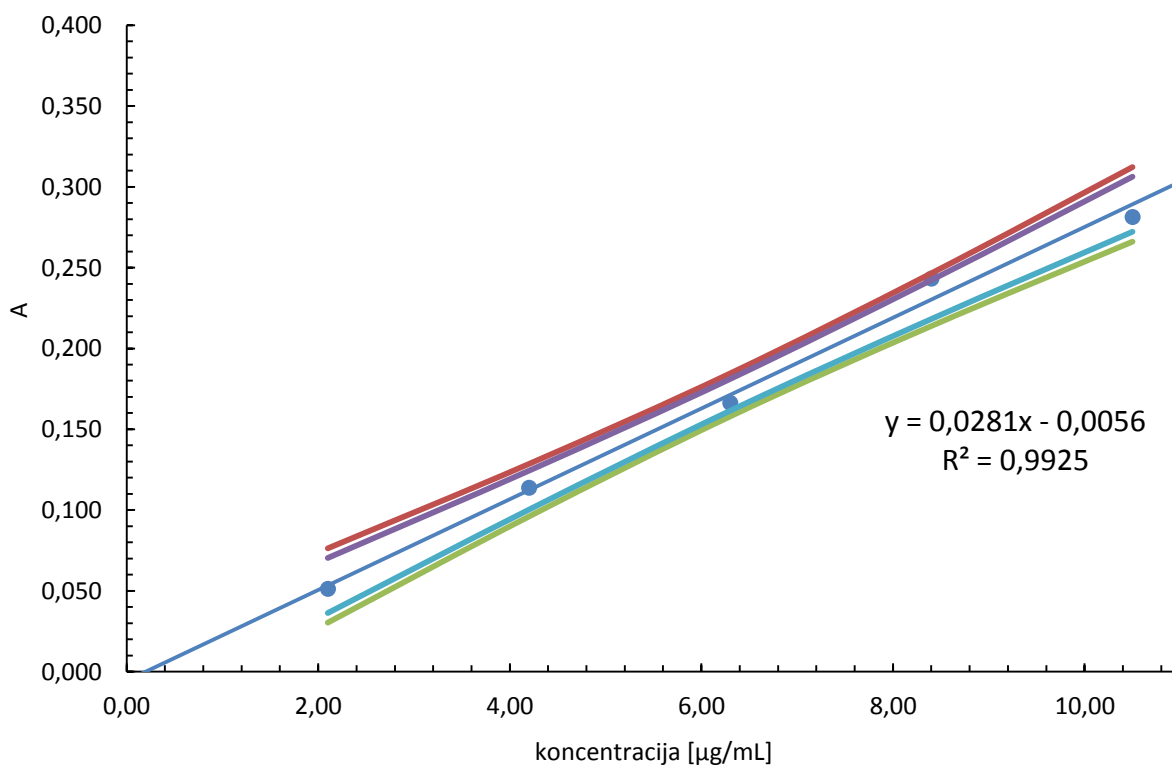


Slika 5-6 Površina obloženih vzorcev 3POLY2DCF in 3POLY3DCF izmerjena z AFM

5.4 Spektrofotometrična metoda

V diplomski nalogi smo določali linearnost in ovrednotili podatke. Določili smo tudi ubežnike z Grubbsovim in Dixonovim testom, homogenosti varianc na posameznem koncentracijskem nivoju smo določili s Cochranovim testom ter izračunali interval zaupanja okrog umeritvene krivulje.

Kot lahko vidimo iz umeritvene krivulje (slika 5-7), je območje linearnosti v koncentracijskem območju 2-10 $\mu\text{g/mL}$. Vse meritve koncentracije sproščenega DCF iz obloženih vzorcev so bile znotraj linearnega območja. Sodelavci Laboratorija za analizo kemijo in industrijsko analizo ter Inštituta za biomedicinske vede so določili LOQ za DCF, katere vrednost je bila manjša od 1. koncentracijske točke pri zasnovi umeritvene krivulje. Cochranov test je potrdil homogenost varianc na vsakem koncentracijskem nivoju. Koeficient kvalitete predstavlja zadovoljivo linearnost, saj je njegova vrednost manjša od 5,0 %, natančneje 4,7 %. Z uporabo Grubbsovega in Dixonovega testa za določitev ubežnikov na posameznem koncentracijskem nivoju pa smo ugotovili, da ubežnikov ni bilo.



Slika 5-7 Umeritvena krivulja s 95- in 90-odstotnim intervalom zaupanja

6 Zaključek

V diplomskem delu smo ugotavljali možnost uporabe večslojnih oblog, sestavljenih iz slojev polimerne mešanice in zdravilne učinkovine diklofenaka (DCF), ki spada v družino nesteroidnih protivnetnih zdravil (NSAID), v ortopediji in zobozdravstvu.

Za namene eksperimentalnega dela smo uporabili zlitino Ti90/Al6/V4, katero smo v začetni fazi postopka površinsko obdelali z brušenjem. Kasneje smo zbrušene vzorce izmenično oblagali s 5 ali 6 sloji mešanice polimera, ki je vsebovala natrijev deoksilat, polihidroksietil metakrilat, polihidroksipropil metakrilat (NaDOC, PHEMA, PHPMA) in DCF.

Na tako obloženih vzorcih smo izvedli 3 vrste analiz: karakterizacijo tankih filmov z ATR-FTIR (infrardeča spektroskopija oslabiljenega totalnega odboja) in AFM (tehnika mikroskopije na atomsko silo) metodo, *in vitro* testiranje sproščanja in spektrofotometrično analizo sproščenega DCF.

Karakterizacija tankih filmov je pokazala izmenične sloje mešanice polimerov in diklofenaka.

Študija *in vitro* testiranja sproščanja je pokazala, da je v obeh sistemih sproščanje sledilo trem stopnjam: prvih 60 minut je bilo zelo hitro, naslednja faza do 360 minut hitro in zadnja faza od 360 minut naprej zelo počasi, kar nakazuje, da bi odmerek zdravila lahko prilagodili posameznemu pacientu. Sproščanje je potekalo 24 ur.

Potrdili smo, da je potencial takšnega sistema oblog za klinično uporabo v ortopediji in zobozdravstvu velik, kar pa ne samo izboljša kakovost življenja bolnikom po operativnem posegu, temveč tudi podaljšuje življenjsko dobo cenovno ugodnim in nerjavnim implantatom.

V nadaljne analize bi lahko vključili spremembo pH sprejemnega medija (potencialni dodatek surfaktanta), elektrokemijske meritve (študij korozije), dobro bi bilo opraviti tudi test biokompatibilnosti in živost celic. S pomočjo testa biokompatibilnosti bi ugotovili, ali se iz naših oblog sproščajo toksični produkti, kateri bi onemogočili sposobnost pravilnega odziva materiala v odnosu do pacienta.

7 Literatura

- [1] E. J. Tobin. Recent coating developments for combination devices in orthopedic and dental applications: A literature review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017
- [2] M. Finšgar, A. Uzunalić, J. Stergar, L. Gradišnik, U. Maver. Novel chitosan/diclofenac coatings on medical grade stainless steel for hip replacement applications. *Scientific Reports* 6, 2016
- [3] G. Horvat, K. Xhanari, M. Finšgar, L. Gradišnik, U. Maver, Ž. Knez, Z. Novak. Novel ethanol-induced pectin-xanthan aerogel coatings for orthopedic applications. *Carbohydrate Polymers* 166, 365-376, 2017
- [4] C. Wu, Y. Ramaswamy, D. Gale, W. Yang, K. Xiao, L. Zhang, Y. Yin, H. Zreiqat. Novel sphene coatings on Ti-6Al-4V for orthopedic implants using sol-gel method. *Acta Biomaterialia*, 4, 569-576, 2008
- [5] S. Kim, J. Keun Hong, Y. Na, J. Yeom, S. Eon Kim. Development of TiAl alloys with excellent mechanical properties and oxidation resistance
- [6] Omudhome Ogbu, PharmD. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. http://www.medicinenet.com/nonsteroidal_antiinflammatory_drugs/article.htm (dostop 20.6.2017)
- [7] Drugs.com. Diclofenac. <https://www.drugs.com/diclofenac.html> (dostop 20.6.2017)
- [8] M. Finšgar. Kemometrija, skripta. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2017
- [9] U. Maver, T. Velnar, M. Gaberšček, O. Planinšek, M. Finšgar. Recent progressive use of atomic force microscopy in biomedical applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 80, 96-111, 2016
- [10] Z. Samardžija. Osnove metod SEM in AFM za preiskave površin. *Vakuumist* 24/1-2, 2004
- [11] Ultravijolična spektroskopija. <http://keminfo.pef.uni-lj.si/ro03m/uv.htm> (dostop 29.7.2017)
- [12] M. Bradley. FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR). <https://www.thermofisher.com/si/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html> (dostop 29.6.2017)
- [13] Brian C. Smith. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Second Edition. Florida: CRC Press, 2011
- [14] POLOS. Spin 150i. <https://www.spincoating.com/en/spin-processor-models-substrate-sizes/spin-coater-spin150i-spin-processor-spincoating-machine/77/> (dostop 29.6.2017)
- [15] Logan Instruments. LOGAN SYSTEM 912-6. <http://products.loganinstruments.com/System912-6.php> (dostop 30.6.2017)