

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Jasmina J. Stojkowska

**DOBIJANJE I KARAKTERISANJE  
NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA NA BAZI  
ALGINATA I NANOČESTICA SREBRA ZA  
PRIMENU U BIOMEDICINI**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jasmina J. Stojkovska

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF  
NANOCOMPOSITE HYDROGELS BASED ON  
ALGINATE AND SILVER NANOPARTICLES FOR  
BIOMEDICAL APPLICATIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

**Mentor:**

---

Prof. dr Bojana Obradović, redovni profesor  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

---

Prof. dr Vesna Mišković-Stanković, redovni profesor  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Prof. dr Maja Vukašinović-Sekulić, vanredni profesor  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Prof. dr Marina Milenković, redovni profesor  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_, Beograd

*Na prvom mestu želela bih da se zahvalim svom mentoru, prof. dr Bojani Obradović, na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći, savetima i sugestijama prilikom izrade ove doktorske disertacije. Takođe, zahvaljujem se prof. dr Vesni Mišković-Stanković na stručnim savetima i podršci. Zahvaljujem se prof. dr Maji Vukašinović-Sekulić na pomoći oko izvođenja i analize rezultata antimikrobne aktivnosti, kao i prof. dr Marini Milenković na pomoći oko izvođenja in vivo studija.*

*Posebno bih želela da se zahvalim svojim kolegama Željki Đurđević, Jovani Zvicer, Danijeli Kostić, Srđanu Vidoviću, Ivani Madžovskoj i Andrei Osmokrović na pomoći u toku eksperimentalnog rada i savetima prilikom pisanja doktorske disertacije.*

*Želela bih da se zahvalim svojim roditeljima na dragocenoj podršci i nesebičnoj pomoći koju su mi pružali tokom izrade ove doktorske disertacije. I na kraju bih želela da se zahvalim svome suprugu Vladimiru, ćerki Teodori i sinu Andreju na beskrajnom razumevanju i strpljenju.*

*Jasmina Stojkowska*

# DOBIJANJE I KARAKTERISANJE NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA NA BAZI ALGINATA I NANOČESTICA SREBRA ZA PRIMENU U BIOMEDICINI

## REZIME

Razvoj novih nanokompozitnih biomaterijala za biomedicinsku primenu zahteva različita ispitivanja i karakterisanje biomaterijala kako sa stanovišta hemijskog sastava i fizičkih svojstava, tako i sa stanovišta biokompatibilnosti i funkcionalnosti. Uz to, da bi se razvio optimizovan biomaterijal potrebno je rezultate svih ispitivanja povezati i objasniti radi mogućnosti pouzdanog predviđanja ponašanja i funkcije biomaterijala u željenoj bimedicijskoj primeni.

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bio ispitivanje mogućnosti dobijanja antimikrobnih hidrogelova u različitim oblicima iz koloidnih rastvora alginata sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra i sveobuhvatna karakterizacija proizvedenih nanokompozita u *in vitro* i *in vivo* uslovima. *In vitro* karakterizacija je obuhvatila ispitivanja citotoksičnosti, biomehaničkih karakteristika, antimikrobne aktivnosti i otpuštanja srebra, dok je u *in vivo* studijama ispitana funkcionalnost nanokompozita za potencijalnu biomedicinsku primenu u tretmanu rana.

Rezultati istraživanja su pokazali da se prilikom elektrohemijske sinteze nanočestica u alginatnom rastvoru dobijaju stabilni Ag/alginatni koloidni rastvori koji su pogodni za sterilizaciju, manipulaciju, kao i za dobijanje nanokompozitnih hidrogelova različitih oblika uz zadržavanje i očuvanje nanočestica srebra. Uz to, pokazalo se da se pH vrednost Ag/alginatnog koloidnog rastvora može sniziti dodavanjem meda što je atraktivno za tretman rana uz potencijalan sinergistički efekat nanočestica srebra i meda. Takođe, iz dobijenih smeša sa medom, kao i sa drugim polimerima kao što su poli(vinil alkohol) i poli(*N*-vinil-2-pirolidon), mogu se dobiti nanokompozitni hidrogelovi različitih poboljšanih karakteristika. Ispitivanja sušenja i rehidratacije nanokompozitnih hidrogelova su pokazala da je nakon sušenja očuvano ~80-85 % inicijalnih nanočestica, dok hidrogel zadržava kapacitet bubrenja i otpuštanja nanočestica i jona srebra. Ispitivanje biomehaničkih karakteristika Ag/alginatnih hidrogelova u biomimicnom

bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom je pokazalo da nanočestice srebra inkorporisane unutar alginatnog hidrogela uzrokuju male promene modula elastičnosti. Ispitivanja citotoksičnosti Ag/alginatnih hidrogelova na telećim hondrocitima u monosloju i u 3D ćelijskoj kulturi u perfuzionom bioreaktoru su pokazala da su ćelije u monosloju osetljivije na nanočestice i jone srebra u poređenju sa imobilisanim ćelijama u alginatnim mikročesticama. Kada je koncentracija ukupno otpuštenog srebra iznosila  $\geq 7$   $\mu\text{g/ml}$  zapažen je jak citotoksični efekat na ćelije u monosloju, dok koncentracija od  $\sim 9$   $\mu\text{g/ml}$  nije imala značajan uticaj na ćelije koje su bile imobilisane unutar alginatnog hidrogela. Sa druge strane, koncentracija ukupnog otpuštenog srebra od  $\sim 10$   $\mu\text{g/ml}$  odlažila je rast *E. coli* i *S. aureus* u suspenziji što ukazuje na mogućnost optimizacije sastava nanokompozita radi postizanja antimikrobne aktivnosti bez citotoksičnog efekta. Ispitivanje funkcionalnosti nanokompozitnih biomaterijala na modelu opekotina kod pacova je pokazalo da su sve tretirane rane zarastale značajno brže od netretiranih dok je taj efekat bio nešto manje izražen u modelu nekroze kod pacova. Pri tome su nanokompozitni biomaterijali na bazi alginata i nanočestica srebra pokazali statistički ekvivalentne rezultate kao komercijalna Ca-alginatna obloga sa jonskim srebrom i krema sa srebro-sulfodiazinom iako je količina srebra naneta na ranu bila oko 100 puta manja.

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da nanokompozitni biomaterijali na bazi nanočestica srebra i alginata, u obliku rastvora i hidrogelova, imaju potencijal za biomedicinsku primenu kao komponente za inženjerstvo tkiva ili implanti za meka tkiva, kao i za antimikrobne obloge za lečenje površinskih, kao i dubokih, nekrotičnih rana.

**Ključne reči:** nanočestice srebra, alginat, nanokompozitni hidrogelovi, biomimični bioreaktor, otpuštanje srebra, citotoksičnost, antibakterijska aktivnost, model opekotina kod pacova, model opekotina kod miševa, model nekroze kod pacova

**Naučna oblast:** HEMIJA I HEMIJSKA TEHNOLOGIJA

**UDK broj:** 620.3:544.773.432:546.57:57.089

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF NANOCOMPOSITE HYDROGELS  
BASED ON ALGINATE AND SILVER NANOPARTICLES FOR BIOMEDICAL  
APPLICATIONS

ABSTRACT

Development of novel nanocomposite biomaterials for biomedical applications requires comprehensive evaluation and characterization of biomaterials such as determination of the chemical composition, physical properties, biocompatibility and functionality. In addition, successful development of biomaterials for potential biomedical applications requires all inclusive association of all the results for reliable prediction of the behavior and functionality of biomaterials in the desired application.

The aim of this doctoral thesis was to investigate possibilities for production of antimicrobial hydrogels in different forms from alginate colloid solutions with electrochemically synthesized silver nanoparticles, as well as comprehensive evaluation of the obtained nanocomposites under *in vitro* and *in vivo* conditions. *In vitro* studies included assessment of cytotoxicity, biomechanical properties, antimicrobial activity and silver release, while *in vivo* studies comprised functionality evaluation of the nanocomposites for potential biomedical applications in wound treatment.

The obtained results have shown that electrochemical synthesis of silver nanoparticles in alginate solutions yielded stable Ag/alginate colloid solutions that proved to be suitable for sterilization, manipulation, and production of nanocomposite hydrogels with retention of silver nanoparticles. In addition, it was shown that the pH of Ag/alginate colloid solutions could be decreased by adding honey into the solution yielding mixtures of Ag/alginate colloid solution and honey attractive for wound treatment due to potential synergistic effects of silver nanoparticles and honey. In addition, it was shown that Ag/alginate colloid solutions with honey, as well as with poly(vinyl alcohol) and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) could be used for production of nanocomposite hydrogels with improved properties. Studies of drying and rehydration of nanocomposite hydrogels have indicated successful preservation of ~80–85 % of the initial

nanoparticles while the hydrogel retained the capacity for reswelling and release of AgNPs and/or ions. Biomechanical characterization of Ag/alginate hydrogels in a biomimetic bioreactor with dynamic compression has shown that incorporation of silver nanoparticles within the alginate hydrogel induced slight changes in elastic moduli. Cytotoxicity studies of Ag/alginate hydrogels in monolayer and 3D cell cultures of bovine calf chondrocyte cultures in perfusion bioreactors have shown higher sensitivity of cells in monolayers for silver nanoparticles and ions than cells immobilized in alginate microbeads. Total released silver concentrations of  $\geq 7$   $\mu\text{g/ml}$  induced severe cytotoxicity to cells in monolayers, while concentrations of  $\sim 9$   $\mu\text{g/ml}$  were not cytotoxic for cells within the alginate matrix. On the other hand, total released silver concentrations of  $\sim 10$   $\mu\text{g/ml}$  induced growth delays in bacterial suspensions of *E. coli* i *S. aureus*. The obtained results indicated possibilities for optimization of nanocomposites in order to achieve antimicrobial activity without cytotoxic effects. Results of *in vivo* studies in a rat burn model have shown significantly faster healing in all treated groups as compared to the untreated control, while the effect was less prominent in a rat necrosis model. Nanocomposite biomaterials based on alginate and silver nanoparticles have shown statistically equivalent results as a commercial Ca-alginate wound dressing with silver ions and a cream with silver sulfadiazine while silver concentrations in the Ag/alginate nanocomposites were 100-fold lower than those in the commercial products.

Obtained results in this doctoral thesis indicated potentials of the novel nanocomposite solutions and hydrogels based on silver nanoparticles and alginate for biomedical applications as components of tissue engineering scaffolds or soft tissue implants as well as constituents of antimicrobial wound dressings for treatments of superficial, as well as deep, necrotic wounds.

**Keywords:** silver nanoparticles, alginate, nanocomposite hydrogels, biomimetic bioreactor, silver release, cytotoxicity, antibacterial activity, rat burn model, murine burn model, rat necrosis model.

**Scientific Field:** CHEMISTRY AND CHEMICAL TECHNOLOGY

**UDC number:** 620.3:544.773.432:546.57:57.089



## SADRŽAJ

UVOD .....	1
1. TEORIJSKI DEO .....	3
1.1 Alginat .....	3
1.1.1 Elektrostatička ekstruzija .....	7
1.1.2 Primena alginata .....	13
1.2 Poli(vinil alkohol) .....	13
1.3 Poli(N-vinil-2-pirolidon) .....	17
1.4 Nanočestice srebra .....	18
1.4.1 Mehanizam rasta nanočestica srebra .....	22
1.4.2 Antimikrobna svojstva nanočestica srebra .....	24
1.5 Biomedicinska primena hidrogelova .....	25
1.5.1 Inženjerstvo tkiva .....	25
1.5.1.1 Hrskavica i kost .....	26
1.5.1.2 Komponente inženjerstva tkiva .....	33
1.5.2 Obloge za rane .....	41
1.5.2.1 Građa kože .....	41
1.5.2.2 Tipovi rana .....	44
1.5.2.3 Proces zarastanja rana .....	45
1.5.2.4 Tretman rana .....	49
1.6 Karakterisanje nanokompozitnih hidrogelova za biomedicinsku primenu . .....	53
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	59

3. MATERIJALI I METODE .....	60
3.1 Materijali .....	60
3.2 Sinteza Ag/alginatnih koloidnih rastvora .....	61
3.3 Ispitivanje stabilnosti Ag/alginatnih koloidnih rastvora .....	63
3.4 Ispitivanje mogućnosti mešanja Ag/alginatnih koloidnih rastvora sa različitim polimerima .....	65
3.5 Dobijanje nanokompozitnih hidrogelova u obliku diskova .....	65
3.6 Dobijanje nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikročestica .....	66
3.7 Dobijanje nanokompozitnih hidrogelova u obliku mikrovlakana .....	69
3.8 Dobijanje i rehidratacija suvih nanokompozitnih mikročestica .....	70
3.9 Ispitivanje biomehaničkih karakteristika nanokompozitnih hidrogelova ....	71
3.10 Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica .....	74
3.10.1 Izolacija ćelija .....	75
3.10.1.1 Izolacija humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi .....	75
3.10.1.2 Izolacija telećih hondrocita iz artikularne hrskavice .....	76
3.10.2 Test citotoksičnosti .....	76
3.10.3 Ispitivanje citotoksičnosti u suspenziji ćelija .....	77
3.10.4 Ispitivanje citotoksičnosti u monosloju hondrocita .....	78
3.10.5 Ispitivanje citotoksičnosti u 3D ćelijskoj kulturi u perfuzionom bioreктору .....	79
3.11 Antimikrobna aktivnost .....	81
3.12. Ispitivanje otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica .....	82
3.12.1 Ispitivanje otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u statičkim uslovima .....	83

3.12.2 Ispitivanje otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica uz mešanje u vodenom kupatilu .....	83
3.12.3 Ispitivanje otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u perfuzionom bioreaktoru sa recirkulacijom .....	84
3.13 <i>In vivo</i> studije efikasnosti Ag/alginatnih nanokompozita .....	84
3.13.1 Model opekotina na pacovima .....	84
3.13.2 Ispitivanje efikasnosti Ag/alginatnog koloidnog rastvora na modelu opekotina II stepena kod pacova .....	85
3.13.3 Ispitivanje efikasnosti Ag/alginatnih mikrovlakana na modelu opekotina II stepena kod pacova .....	86
3.13.4 Model opekotina na miševima .....	87
3.13.5 Ispitivanje efikasnosti Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom na modelu opekotina II stepena kod miševa .....	88
3.13.6 Model nekroze na pacovima .....	89
3.13.7 Ispitivanje efikasnosti Ag/alginatnih mikrovlakana na modelu nekroze kod pacova .....	90
3.13.8 Ispitivanje efikasnosti Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom na modelu nekroze kod pacova .....	90
3.13.9 Mikrobiološka analiza .....	91
3.13.10 Histološka analiza .....	92
3.13.11 Statistička analiza .....	93
3.14 Metode karakterizacije Ag/alginatnih nanokompozita .....	93
3.14.1 UV-vidljiva spektroskopija .....	93
3.14.2 Transmisiona elektronska mikroskopija .....	94
3.14.3 Koncentracija srebra u Ag/alginatnim nanokompozitima .....	94
3.14.4 Optička mikroskopija .....	95

3.14.5 FE–skenirajuća elektronska mikroskopija (Field-Emission Scanning Electron Microscopy) .....	95
3.14.6 Određivanje koncentracije i vijabilnosti imobilisanih hondrocita .....	96
4. REZULTATI .....	97
4.1 Optimizacija Ag/alginatnog koloidnog rastvora .....	97
4.1.1 Stabilnost Ag/alginatnih koloidnih rastvora .....	98
4.1.2 Dobijanje Ag/alginatnih koloidnih rastvora različitih koncentracija .....	102
4.1.3 Uticaj sterilizacije koloida na stabilnost nanočestica .....	104
4.1.4 Razvoj Ag/alginatnih koloidnih rastvora stabilnih u blago kiseloj sredini .....	105
4.1.5 Dobijanje nanokompozitnih polimernih smeša na bazi alginata i nanočestica srebra .....	114
4.2 Dobijanje nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra .....	115
4.2.1 Dobijanje Ag/alginatnih mikročestica primenom elektrostatičke ekstruzije .....	115
4.2.2 Dobijanje i rehidratacija suvih Ag/alginatnih mikročestica .....	121
4.2.3 Dobijanje Ag/alginatnih mikročestica sa medom .....	125
4.2.4 Dobijanje PVA/Ag/alginatnih mikročestica .....	127
4.2.5 Dobijanje Ag/alginatnih mikrovlakana .....	129
4.2.6 Dobijanje Ag/alginatna mikrovlakna sa medom .....	133
4.3 <i>In vitro</i> karakterisanje nanokompozitnih hidrogelova .....	137
4.3.1 Ispitivanje mehaničkih karakteristika nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra .....	137

4.3.1.1 Ispitivanje mehaničkih karakteristika pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica .....	<b>138</b>
4.3.1.2 Ispitivanje mehaničkih karakteristika pakovanog sloja PVA/Ag/alginatnih čestica .....	<b>142</b>
4.3.1.3 Ispitivanje mehaničkih karakteristika PVA/Ag/alginatnih i PVP/PVA/Ag alginatnih diskova .....	<b>145</b>
4.3.2 Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica .....	<b>147</b>
4.3.2.1 Ispitivanje citotoksičnosti u suspenziji humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi .....	<b>148</b>
4.3.2.2 Ispitivanje citotoksičnosti u monosloju telećih hondrocita .....	<b>150</b>
4.3.2.3 Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica u 3D ćelijskoj kulturi u perfuzionom bioreктору .....	<b>154</b>
4.3.3 Ispitivanje antibakterijske aktivnosti nanokompozitnih hidrogelova .....	<b>155</b>
4.4 <i>In vivo</i> ispitivanja .....	<b>158</b>
4.4.1 Uticaj Ag/alginatnih nanokompozita na zarastanje opekotina II stepena kod pacova .....	<b>158</b>
4.4.1.1 Ispitivanje efikasnosti Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa askorbinskom kiselinom na modelu opekotina II stepena kod pacova .....	<b>159</b>
4.4.1.2 Ispitivanja efikasnosti Ag/alginatnih mikrovlakana na modelu opekotina II stepena kod pacova .....	<b>172</b>
4.4.2 Ispitivanja efikasnosti Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom na zarastanje opekotina II stepena kod miševa .....	<b>187</b>
4.4.3 Uticaj Ag/alginatnih nanokompozita na zarastanje hroničnih rana na modelu nekroze kod pacova .....	<b>195</b>
4.4.3.1 Ispitivanja efikasnosti suvih Ag/alginatnih mikrovlakana na modelu nekroze kod pacova .....	<b>197</b>

4.4.3.2 Ispitivanja Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom na modelu nekroze kod pacova .....	<b>208</b>
5. DISKUSIJA .....	<b>222</b>
6. ZAKLJUČAK .....	<b>243</b>
7. PRILOG .....	<b>249</b>
7.1. Spisak slika .....	<b>249</b>
7.2. Spisak tabela .....	<b>278</b>
8. LITERATURA .....	<b>281</b>

## UVOD

Nanotehnologija je nauka koja proučava fizičke, hemijske i biološke osobine nanomaterijala, kao i tehnologije za proizvodnju nanomaterijala sa posebnim i jedinstvenim osobinama. Materijali nanodimenzija imaju niz specifičnih karakteristika, koje ih razlikuju od materijala makroskopskih veličina. Metalne nanočestice, posebno nanočestice srebra, su poslednjih nekoliko decenija fokus istraživanja mnogih istraživačkih grupa i već se mogu naći u medicinskim, kozmetičkim i drugim proizvodima za široku upotrebu.

Nanočestice srebra pored optičkih i katalitičkih osobina, imaju i antimikrobnu aktivnost prema različitim bakterijama, gljivama i virusima. Danas je srebro kao antimikrobni agens ponovo atraktivno za medicinsku upotrebu, usled stalnog povećanja broja mikroorganizama otpornih na postojeće antibiotike. Stoga su razvijeni različiti medicinski proizvodi koji sadrže srebro, kao što su antimikrobne obloge za rane, masti, i premazi. Pri tome, smatra se da su nanočestice srebra potentnije od jona srebra usled vezivanja i interakcija sa ćelijskom membranom bakterija, otpuštanja jona srebra i, eventualno, prodiranja u unutrašnjost ćelije. Međutim, jedan od ključnih problema za primenu nanočestica srebra je njihova tendencija ka aglomeraciji, što umanjuje njihovu aktivnost. Ovaj problem se može prevazići stabilizacijom nanočestica u rastvorima ili hidrogelovima polimera kao što su npr. alginat, hitozan, poli(vinil alkohol) i poli(N-vinil-2-pirolidon). Alginat je posebno atraktivan biomaterijal jer lako formira biokompatibilne i biodegradabilne hidrogelove u prisustvu dvovalentnih katjona. Obloge za rane na bazi alginata i jonskog srebra omogućavaju pogodnu sredinu u oštećenom tkivu usled biokompatibilnosti i velike sorpcione moći, kao i antimikrobne aktivnosti, što dovodi do brže granulacije i reepitelizacije oštećenog tkiva.

Cilj ove doktorske disertacije je stoga bio da se ispita mogućnost dobijanja novih nanokompozitnih biomaterijala na bazi alginata sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra, u cilju postizanja pojačane antimikrobne

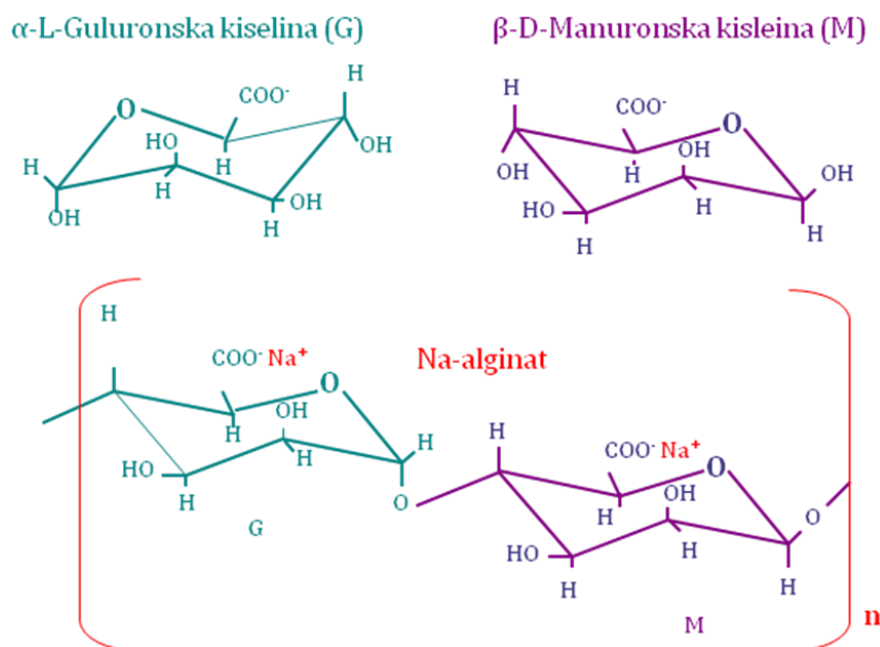
aktivnosti i produženog dejstva usled kontrolisanog otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra. Uz to, razvoj novih nanokompozitnih biomaterijala za biomedicinsku primenu zahteva različita ispitivanja i karakterisanja biomaterijala kako sa stanovišta hemijskog sastava i fizičkih svojstava, tako i u pogledu biokompatibilnosti i funkcionalnosti u *in vitro* i *in vivo* uslovima, pri čemu je od posebnog značaja ispitivanje citotoksičnosti i interakcija nanočestica i ćelija. Danas se za ispitivanje citotoksičnosti koriste klasične *in vitro* metode u kulturama ćelija u monosloju i suspenziji, nakon čega slede skupe *in vivo* studije na životinjama. Međutim, glavni problem ispitivanja citotoksičnosti je kontradiktornost *in vitro* i *in vivo* rezultata. Jedano od mogućih rešenja je ispitivanje citotoksičnosti u biomimičnim bioreaktorskim sistema koji imitiraju prirodnu sredinu i predstavljaju pogodne instrumente za fiziološki relevantne studije interakcija ćelija i biomaterijala što bi moglo da smanji obim neophodnih testova na životinjama. U tom kontekstu je drugi cilj ove doktorske disertacije bio i sveobuhvatna karakterizacija dobijenih nanokompozitnih materijala i povezivanje različitih aspekata svojstava i *in vitro* funkcionalnosti nanomaterijala kao što su biomehaničke karakteristike, citotoksičnost, antimikrobna aktivnost i otpuštanje srebra, sa efikasnošću u tretmanu rana u primenjenim *in vivo* studijama na malim životinjama.



# 1. TEORIJSKI DEO

## 1.1 ALGINAT

Alginat, komercijalno dostupan kao natrijumova so, odnosno natrijum-alginat, je visokomolekularni linearni polisaharid koji predstavlja kopolimer  $\beta$ -D-manuronske (M) i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G). Ostaci ovih kiselina su međusobno povezani 1,4-glikozidnim vezama (Martinsen i sar., 1989, Moe i sar., 1995, Gombotz i sar., 1998) kao što je prikazano na slika 1.1. Prirodni Na-alginat se dobija ekstrakcijom iz ćelijskog zida smeđih algi (*Phaeophyceae*, uglavnom iz reda *Laminariales*).

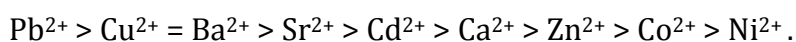


**Slika 1.1.** Molekulske formule  $\beta$ -D-manuronske kiseline (M jedinica),  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G jedinica) i natrijum alginata

U svim organizmima koji proizvode alginat nalaze se manuronske C-5 epimeraze koje, katališući C-5-epimerizaciju M-uronatnih jedinica u G-uronatne jedinice, kontrolišu hemijski sastav polimera i raspodelu segmenata monomera duž lanca.

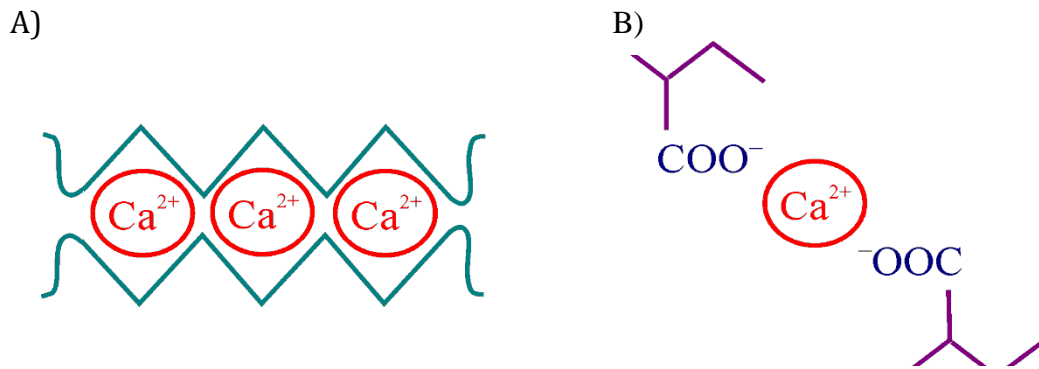
Dokazano je da su G i M jedinice povezane u blokove koji mogu biti homopolimerni G blokovi (GG), homopolimerni M blokovi (MM) i heteropolimerni naizмениčno raspoređeni blokovi (MG i GM). Količina i distribucija G i M blokova zavisi od vrste, lokacije i starosti alge iz koje je alginat izolovan (*Drury i sar., 2003*) tako da se komercijalni alginati veoma razlikuju po svom sastavu, pa čak mogu postojati i velike varijacije u M/G odnosu kod alginata dobijenih iz istog izvora.

Alginati pokazuju veliki afinitet prema dvovalentnim katjonima, i to prema sledećem opadajućem redosledu:



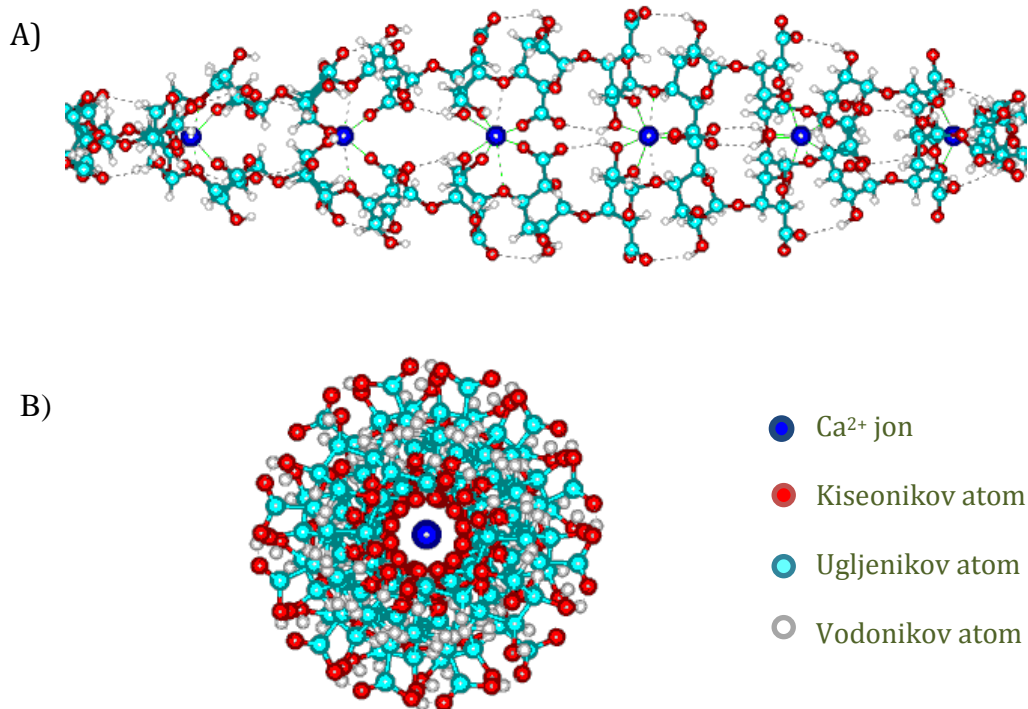
Iz ove pojave proizilazi jedna od veoma bitnih karakteristika alginata, a to je formiranje hidrogelova u prisustvu viševalentnih katjona, tako što dolazi do interakcije između kiselinske grupe G bloka i katjona (*Wong i sar., 2004*). Stoga su reaktivnost sa katjonima i kapacitet obrazovanja gela direktna funkcija prosečne dužine lanca i udela i rasporeda G blokova. Alginati koji sadrže najveći procenat GG frakcija imaju najveću sposobnost da formiraju gelove. Jedan od najčešće korišćenih katjona za dobijanje alginatnih hidrogelova je jon kalcijuma.

U cilju opisivanja mehanizma formiranja gela, pre više od tri decenije postavljen je *egg-box* model (model kutije za jaja) (*Grant i sar., 1973*), koji se i danas koristi za analizu specifičnih interakcija između dvovalentnih katjona i polisaharidnih lanaca koje dovode do kohezije između lanaca i stvaranja čvrste gel strukture. Prema ovom modelu, katjoni se u alginatu vezuju najpre samo za guluronske ostatke, sve dok ne dođe do zasićenja, odnosno sve dok ne budu popunjena sva slobodna mesta na guluronskim ostacima za vezivanje. Pri tome se dva ili više poliguluronatnih lanaca međusobno vezuju stvarajući šupljine poput onih u kutiji za jaja za smeštanje dvovalentnog jona što je prikazano na primeru kalcijuma na slici 1.2a. Sa daljim dodavanjem  $\text{Ca}^{2+}$  jona, počinju da ih vezuju i manuronski ostaci jonskim interakcijama sa karboksilnim grupama  $\text{COO}^-$  (slika 1.2b). Ove veze su slabije od veza sa GG blokovima i lakše se raskidaju jonskom izmenom.



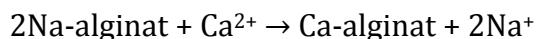
**Slika 1.2.** Vezivanje  $\text{Ca}^{2+}$  jona za alginatne lance: A) "egg-box" model (model kutije za jaja) vezivanja jona kalcijuma u šupljine između GG segmenata; B) jonske interakcije sa karboksilnim grupama u MM blokovima (Bajpai i Sharma, 2004)

Na slici 1.3 je prikazana struktura modela Ca-poli- $\alpha$ -L-guluronata.



**Slika 1.3.** Heliks Ca-poli- $\alpha$ -L-guluronata: A) pogled duž ose sa prikazom vodoničnih veza i mesta vezivanja jona kalcijuma; B) pogled normalno na osu

Proces geliranja Na-alginata se može predstaviti reakcijom jednostavne zamene jona natrijuma jonima kalcijuma pri čemu nastaje kalcijum-alginat:



Kalcijum-alginatni hidrogel se može formirati pod izuzetno blagim uslovima, kao što su sobna ili telesna temperatura, fiziološka pH vrednost i izotonični rastvori, pošto joni  $\text{Ca}^{2+}$  mogu lako da zamene jone  $\text{Na}^+$  (*de Vos i sar., 2006*). Međutim, joni kalcijuma takođe vrlo lako mogu biti istisnuti nekim drugim jonima, što može da bude prednost, ali i nedostatak u zavisnosti od krajnje primene alginatnog hidrogela. Struktura Ca-alginata je zasnovana na jonskim vezama, tako da je gel termostabilan u opsegu od 0 do  $100^{\circ}\text{C}$ , pa zagrevanje neće dovesti do tečljivosti gela. Ipak, gel se lako može rastvoriti na neutralnoj pH vrednosti u rastvorima sa visokom koncentracijom natrijuma, kalijuma ili magnezijuma, kao i u prisustvu antigelerajućih agenasa kao što u citrati, laktati i fosfati što dovodi do nekontrolisane i spore degradacije u *in vivo* uslovima (*Smidrod i Skjak-Bræk, 1990, Forster i sar, 2010*). Održavanjem odnosa  $\text{Na}:\text{Ca} \leq 25:1$  izbegava se destabilizacija gela. Isto tako, postizanje hemijske stabilnosti alginatnih gelova se može ostvariti zamenom  $\text{Ca}^{2+}$  jona dvovalentnim katjonima koji imaju veći afinitet prema alginatu, a koji nisu toksični, kao što je  $\text{Sr}^{2+}$  ili dodavanjem viševalentnih katjona kao što su  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ . Treba naglasiti da fizičke karakteristike alginatnih hidrogelova zavise od njihovog sastava, odnosno udela G i M jedinica, ali i od njihovog redosleda (*Smidsrod i sar., 1974, Martinsen 1989, Thu i sar., 1996.*).

Međutim, za primenu u medicini veoma je bitno obezbediti striktnu kontrolu svojstava biomaterijala, a posebno brzine degradacije i biomehaničkih karakteristika (*Augst i sar., 2006*). Kao što je već rečeno alginatni hidrogel se nekontrolisano i sporo degradiraju u *in vivo* uslovima (*Smidrod i Skjak-Bræk, 1990, Forster i sar., 2010*). Pri tome, generalno, hidrogelovi najpre bubre, a zatim dolazi i do razaranja strukture, ali ovaj proces nije sasvim ispitan. Ispitivanja kinetike i mehanizma degradacije alginatnih čestica u 0,1 M rastvoru fosfatno puferisanog rastvora natrijum-hlorida su pokazala da se u prisustvu veće koncentracije jona natrijuma prvo zamenjuju joni kalcijuma vezani za manuronske ostatke. Pri tome dolazi do povećavanja elektrostatičkog odbijanja karboksilnih grupa i relaksacije

polimernih lanaca, a time i bubrenja hidrogela (*Bajpai i sar., 2008*). Takođe, pokazan je isti mehanizam razgradnje mikročestica alginata u medijumu za kulture ćelija u prisustvu male koncentracije natrijum-citrata (0,05 - 0,5 mM) (*Mitrović i sar., 2010*).

Mehanička čvrstoća alginatnih hidrogelova kao i većine hidrogelova, je generalno mala uz viskoelastično reološko ponašanje (*Doublier i sar., 1992, Junter i Vinet, 2009*). Viskoelastično ponašanje podrazumeva da se materijali pod dejstvom spoljašnje sile ponašaju na način koji se nalazi između ponašanja elastičnih čvrstih tela i tečnosti (*Jovanović i Jeremić, 2007*). Mehanička svojstva alginatnih hidrogelova variraju u zavisnosti od sastava, stepena umreženosti i stepena bubrenja. Pokazano je da se modul elastičnosti pri dinamičkoj kompresiji skoro proporcionalno povećavao sa porastom koncentracije alginata, jer sa porastom koncentracije raste broj veza između alginatnih lanaca u polimernoj mreži (*Junter i Vinet, 2009*). Brojne studije su pokazale da M/G odnos značajno utiče na modul elastičnosti alginatnih hidrogelova, to jest da sa porastom broja G jedinica raste i modul elastičnosti hidrogela što je i očekivano obzirom na jače vezivanje katjona za G jedinice nego za M jedinice (*Mauck i sar., 2000, Stevens i sar., 2004, Junter i Vinter, 2009*). Na mehaničke karakteristike alginatnog hidrogela utiče i sam oblik, tako da individualna alginatna mikročestica ima značajno veći modul elastičnosti pri dinamičkoj kompresiji i Jangov modul elastičnosti od alginatnih diskova (*Wang i sar., 2005, Nguyen i sar., 2009*). Takođe, na mehaničke karakteristike utiču i sami uslovi pripremanja alginatnih hidrogelova kao što su dužina geliranja i koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  jona u rastvoru za geliranje (*LeRoux i sar., 1999, Junter i Vinter, 2009*).

### 1.1.1 ELEKTROSTATIČKA EKSTRUZIJA

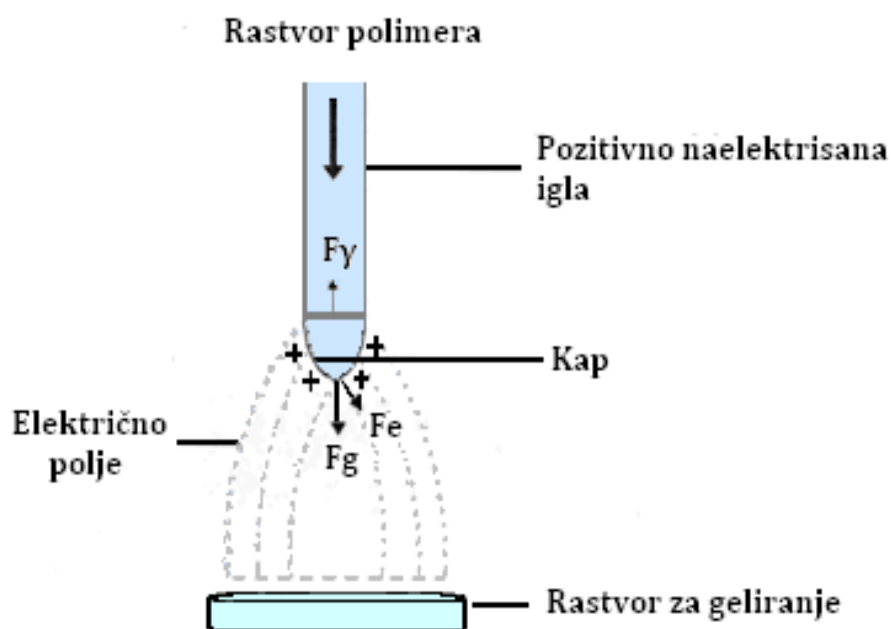
Hidrogelovi mogu biti različitih geometrijskih oblika kao što su diskovi, mikročestice i mikrovlakna. Mikročestice, s obzirom na svoj sferični oblik i prečnik manji od 1 mm, nude optimalan odnos površine u odnosu na zapreminu, kao i manje difuzione limitacije. Stoga je to posebno atraktivan oblik za imobilizaciju i kontrolisano otpuštanje različitih bioaktivnih molekula (*de Vos i sar., 2006*).

Mikrovlakna predstavljaju atraktivan nosač za inženjerstvo tkiva, jer zahvaljujući svom obliku, veličini i poroznosti podsećaju na vanćelijski matriks (*Sill i Recum, 2008*). Pored toga mikrovlakana se komercijalno koriste za obloge za rane, kao što su Vivamel®, Suprasorb®A + Ag, itd.

Značajno mesto u proizvodnji mikročestica i mikrovlakana zauzele su ekstruzione tehnike usled relativno jednostavnog postupka proizvodnje. Ekstruzione tehnike za dobijanje mikročestica obuhvataju: i) metodu ukapavanja, ii) metodu ukapavanja uz primenu sekundarnog toka vazduha (*Anilkumar i sar., 2001, Bučko i sar., 2005*), iii) vibracionu metodu (*Heinze i sar., 2004*), iv) metodu raspršivanja pomoću rotirajućeg ravnog diska (*Ogbonna, 2004*), v) metodu presecanja mlaza (*Prusse i Vorlop, 2004*), i vi) elektrostatičku ekstruziju (*Poncele i sar., 1999, Bugarski i sar., 2004*). Od ekstruzionih tehnika za dobijanje mikrovlakana koriste se: i) spinning pri zagrevanju polimera do tačke topljenja (*Fambri i sar., 1997*), ii) suvi spinning (*Gogolewski i Pennings, 1985*), iii) vlažni spinning (*Pomfret i sar., 2000*), i iv) elektrospinning (*Kwon i sar., 2005, Dai i sar., 2010*).

Elektrostatička ekstruzija, kao tehnika za dobijanje veoma malih čestica (prečnika nekoliko stotina mikrona) uniformne raspodele veličina, pod strogo kontrolisanim uslovima, zasniva se na ekstruziji polimernog rastvora kroz kapilaru uz primenu elektrostatičkog polja, a zatim sakupljanju nastalih kapi u rastvoru za geliranje (*Keshavartz i sar., 1992, Bugarski i sar., 1993*). Razlikuju se tri osnovne geometrije sistema za elektrostatičku ekstruziju: i) geometrija paralelnih ploča (rastvor za geliranje je paralelan sa pločom kroz koju je provučena igla koja predstavlja pozitivnu elektrodu), ii) pozitivno naelektrisan rastvor za geliranje, a igla je uzemljena, i iii) pozitivno naelektrisana igla, a rastvor za geliranje je uzemljen. Pri korišćenju alginata ustanovljeno je da je najefikasniji sistem za proizvodnju mikročestica sistem sa pozitivno naelektrisanom iglom (*Bugarski i sar., 1994a, Bugarski i sar., 1994b, Poncelet i sar., 1999*) (slika 1.4). Pri tome se kapi odvajaju sa vrha kapilare i pod uticajem gravitacije i elektrostatičke sile padaju u rastvor za geliranje u kome dolazi do jonske izmene i očvršćavanja alginatnih

čestica. Elektrostatički potencijal koji se primenjuje između kapilare i rastvora za geliranje indukuje određeno naelektrisanje na površini polimernog rastvora, dovodeći do smanjenja površinskog napona i drastičnog smanjenja veličine kapljica koje se otkidaju, u odnosu na veličinu kapljica dobijenih metodom ukapavanja bez primene električnog polja (Bugarski i sar., 1994a, Bugarski i sar., 1994b, Poncelet i sar., 1999). Prečnik mikročestica varira u zavisnosti od operativnih parametara kao što su primenjeni elektrostatički napon, unutrašnji prečnik igle i rastojanje između elektroda, kao i od fizičkih karakteristika rastvora (Bugarski i sar., 1994a, Bugarski i sar., 1994b, Poncelet i sar., 1999). Ovom metodom dobijene su alginatne mikročestice prečnika manjeg od 1 mm, pa sve do 50  $\mu\text{m}$ .



**Slika 1.4.** Princip formiranja kapi primenom elektrostatičke ekstruzije. Na vrh pozitivno naelektrisane igle dovodi se rastvor polimera. Električno polje se formira između pozitivne igle i uzemljenog rastvora za geliranje. Na kap na vrhu igle deluje sila gravitacije ( $F_g$ ) i elektrostatička sila ( $F_e$ ) koje teže da otkinu kap nasuprot sili površinskog napona ( $F_\gamma$ )

Kao što je već istaknuto, proces formiranja kapi pod dejstvom elektrostatičkog polja je vrlo složena funkcija mnogih parametara kao što su:

primenjeni napon, rastojanje između elektroda i geometrija, protok polimernog rastvora, kao i osobine polimernog rastvora uključujući površinski napon, gustinu i viskoznost (*Poncelet i sar., 1999*). Do danas je razvijeno više različitih modela elektrostatičke ekstruzije (*Poncelet, 1999, Bugarski i sar., 2006*), ali nijedan od njih ne objašnjava u potpunosti različite eksperimentalne rezultate. Ipak, modelovanje je omogućilo bolji uvid u značaj pojedinih parametara koji kontrolišu ovaj proces.

Na kap koja se stvara na vrhu kapilare jednostavnom ekstruzijom tečnosti, deluje sila gravitacije, dok na meniskus deluje sila površinskog napona koja sprečava otkidanje kapi (slika 1.5A). Kada se ove dve sile izjednače kap se otkida sa vrha kapilare i pada u rastvor za geliranje, pri čemu je postignuta ravnoteža sila koje deluju na kap koja pada:

$$F_g = F_\gamma \quad (1.1)$$

gde je  $F_g$  je sila težine, a  $F_\gamma$  sila površinskog napona. Sila težine kapi sferičnog oblika je data jednačinom:

$$F_g = mg = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho g. \quad (1.2)$$

gde su  $r$  poluprečnik kapi,  $g$  gravitaciono ubrzanje ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ ) i  $\rho$  gustina polimernog rastvora.

Sila površinskog napona tečnosti je data jednačinom:

$$F_\gamma = 2\pi r_0 \gamma \quad (1.3)$$

gde su  $r_0$  unutrašnji poluprečnik kapilare i  $\gamma$  površinski napon koji deluje u trenutku otkidanja kapi.

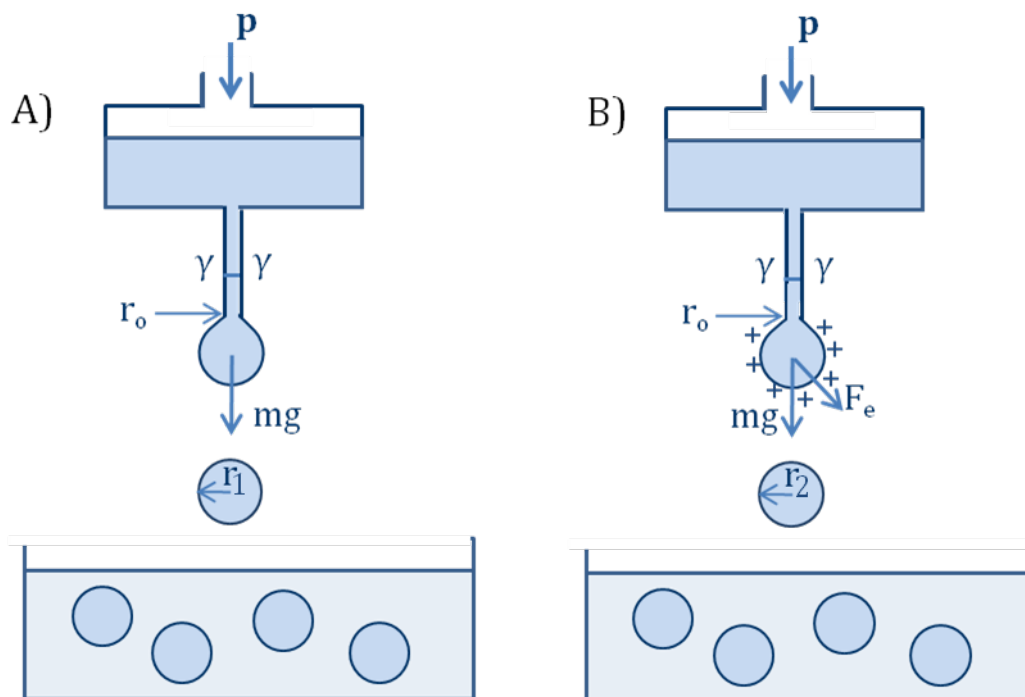
Zamenom jednačina 1.2 i 1.3 u jednačinu 1.1 može se izračunati poluprečnik kapi:

$$\frac{4}{3}\pi r^3 \rho g = 2\pi r_0 \gamma \quad (1.4)$$

$$r = \sqrt[3]{\frac{3r_0\gamma}{2\rho g}} \quad (1.5)$$



Ako se usvoji površinski napon vodenog rastvora natrijum alginata od oko  $40 \text{ mJ/m}^2$  i gustina rastvora od oko  $1000 \text{ kg/m}^3$ , pri unutrašnjem prečniku kapilare u rasponu od 0,5 do 1 mm može se pokazati da se ekstruzijom samo pod dejstvom gravitacije ne mogu dobiti kapi manje od 1 mm.



**Slika 1.5.** Šematski prikaz nastajanja čestica hidrogela ekstruzijom. A) Ekstruzija bez dejstva električnog polja: pod pritiskom  $p$  rastvor polimera se potiskuje kroz kapilaru poluprečnika  $r_o$  pri čemu se formira kap na koju deluje sila gravitacije ( $mg$ ), dok na meniskus deluje sila površinskog napona; pri izjednačavanju ove dve sile dolazi do otkidanja kapi poluprečnika  $r_1$  koja pada u rastvor za geliranje gde očvršćuje u česticu. B) Elektrostatička ekstruzija: pod pritiskom  $p$  rastvor polimera se potiskuje kroz kapilaru poluprečnika  $r_o$  pri čemu se formira kap na koju deluju sila gravitacije ( $mg$ ) i elektrostatička sila ( $F_e$ ), dok na meniskus deluje sila površinskog napona; pri izjednačavanju gravitacione i elektrostatičke sile sa silom površinskog napona otkida se kap poluprečnika  $r_2$  koja pada u rastvor za geliranje gde očvršćuje u česticu

Na kap koja se formira na vrhu kapilare u električnom polju deluju gravitaciona, elektrostatička i sila površinskog napona (slika 1.5B). Primenom električnog napona, potpomognuto je kretanje negativno naelektrisanih molekula ka površini kapi pri čemu se ovi molekuli sudaraju i međusobno odbijaju, što prouzrokuje opadanje površinskog napona i otkidanje kapi. Ravnoteža sila koje deluju na kap koja pada u električnom polju može se predstaviti sledećom jednačinom:

$$F_g + F_e = F_\gamma \quad (1.6)$$

gde je  $F_e$  elektrostatička sila koja zavisi od geometrije sistema i u slučaju da je jedna elektroda igla, a druga elektroda rastvor za prikupljanje čestica, ova sila se može izraziti jednačinom (Bugarski i sar., 2001):

$$F_e = \frac{4\pi\epsilon_0 U^2}{\left[\ln\left(\frac{4h}{r}\right)\right]^2} \quad (1.7)$$

gde su  $\epsilon_0$  električna permitivnost vazduha ( $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ C}^2/\text{Nm}^2$ ),  $h$  rastojanje između elektroda (to jest vrha igle i površine rastvora za geliranje), a  $U$  primenjeni elektrostatički napon.

Uticao primenjenog napona na poluprečnik rezultujuće kapi,  $r$ , dobija se uvođenjem jednačina (1.2), (1.3) i (1.7) u jednačinu (1.6):

$$U = \sqrt{\frac{\ln(4h/r)^2 (c-dr^3)}{2\epsilon_0}} \quad (1.8)$$

gde su konstante  $c$  i  $d$  definisane kao:

$$c = r_0 \gamma \quad (1.9)$$

i

$$d = \frac{2}{3} \rho g \quad (2.0)$$

Ovaj model i jednačina 1.8 su korišćeni za predviđanje veličine alginatnih mikročestica kao funkcije primenjenog napona na pozitivno naelektrisanu iglu za

dve veličine igle i dve koncentracije alginata i pokazano je kvalitativno slaganje sa eksperimentalnim podacima (*Bugarski i sar., 2006*).

### 1.1.2 PRIMENA ALGINATA

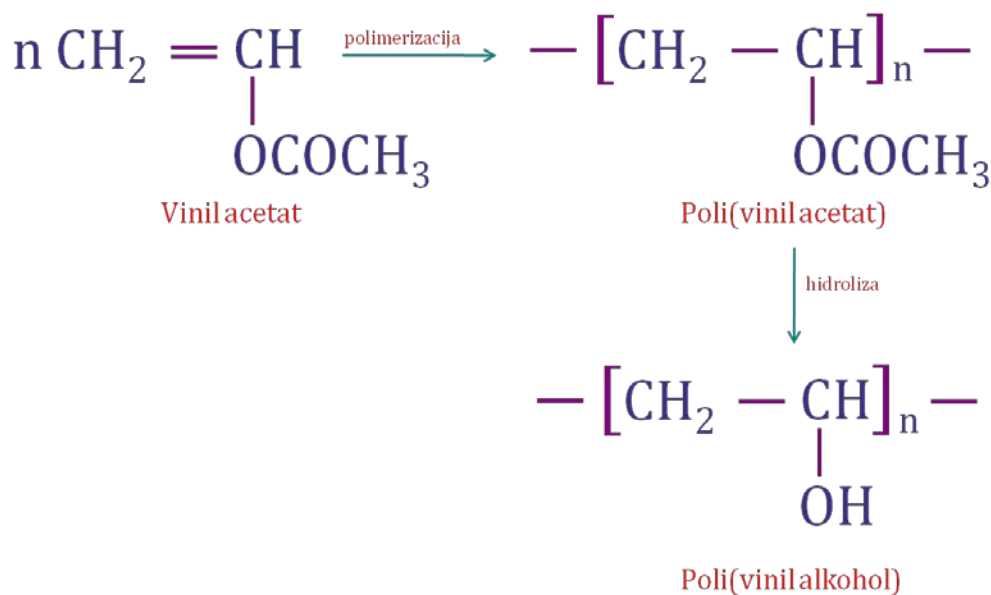
Na-alginat ima odlične karakteristike kao sredstvo za zgušnjavanje, sredstvo za geliranje, stabilizator i emulgator. Danas, zahvaljujući svojim jedinstvenim karakteristikama alginat se primenjuje u prehrambenoj industriji i to u proizvodnji sladoleda, rezanaca, želea, preliva, piva, mlečnih pića itd, kao i u proizvodnji hrane za kućne ljubimce. Takođe, alginat se koristi u tekstilnoj industriji, kao i u proizvodnji papira. Na-alginat je našao primenu u kozmetici kao sredstvo za zgušnjavanje i za održavanje vlažnosti kozmetičkih preparata. U farmaceutskoj industiji Na-alginat se koristi kao komponenta tableta gde sa jedne strane ima ulogu da ubrza njihovo rastvaranje, kako bi se brže oslobodile aktivne supstance, dok s druge strane u kiseloj sredini želuca formira gel i na taj način štiti mukozu želuca.

Ca-alginat je biokompatibilan i biodegradabilan zbog čega se pokazao kao pogodan hidrogel za imobilizaciju različitih bioaktivnih molekula (lekovi, faktori rasta, hormoni, enzimi itd.) i ćelija različitog porekla kao što su ćelije mikroorganizama (bakterije, kvasci, plesni, alge), biljaka i životinja, ali i za imobilizaciju humanih ćelija (*Smidsrod i sar., 1990, Nedović, 1999*). Uspešno su izvedene imobilizacije različitih lekova (*Yang i sar., 2013, Martín i sar., 2015*), enzima (*Taqieddin i Amiji, 2004, Rahim i sar., 2013*), faktora rasta (*Choi i sar., 2010, Kolambkar i sar., 2011*) i hormona (*Lucas i sar., 2015*) unutar matrice alginata. Takođe, alginatni rastvori, kao i hidrogelovi su se pokazali kao pogodani za stabilizaciju nanočestica srebra (*Liu i sar., 2009, Saha i sar., 2009 i 2010*).

### 1.2 POLI(VINIL ALKOHOL)

Poli(vinil alkohol) (PVA) je sintetički, hidrofilni polimer prilično jednostavne strukture (slika 1.6). PVA se dobija polimerizacijom vinil acetata u poli(vinil acetat), a zatim sledi hidroliza poli(vinil acetata) do poli(vinil alkohola).

Hidroliza nije potpuna i zavisi od dužine trajanja reakcije, pa je poli(vinil alkohol) uvek kopolimer poli(vinil alkohola) i poli(vinil acetata). Stepem hidrolize ili sadržaj acetatnih grupa u polimeru ima uticaj na hemijske karakteristike, rastvorljivost i kristalizaciju PVA, jer acetatne grupe slabe vodonične veze između hidroksilnih grupa susednih lanaca, kao i unutar samog lanca (Hassan i Peppas, 2000).



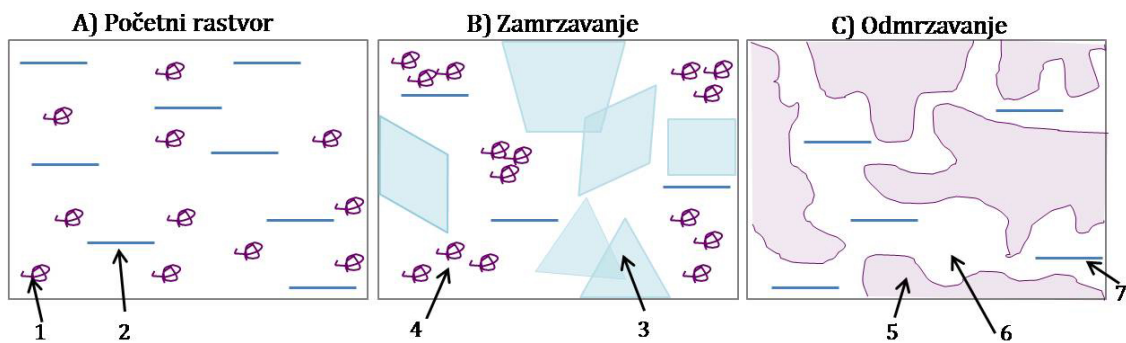
**Slika 1.6.** Dobijanje poli(vinil alkohola) polimerizacijom vinil acetata, praćene hidrolizom poli(vinil acetata)

Rastvor PVA polimera može da formira hidrogel hemijskim ili fizičkim umrežavanjem. Hemijsko umrežavanje se može postići: i) primenom hemijskih agenasa, i ii) različitim zračenjima. Najčešće korišćeni agensi za umrežavanje PVA su: glutaraldehid (Narita i sar., 2001, Patel i Vavia, 2010), formaldehid (Yang i sar., 2012), boratni joni (Lin i sar., 2003), joni bakra (Gong i sar., 2006), kao i smeše glutaraldehyda, metanola, sumporne i sirćetne kiseline (Hasimi i sar., 2008). Nakon umrežavanja, u hidrogelu su prisutni ostaci agenasa za umrežavanje, koji su najčešće toksični (Hassan i Peppas, 2000). Stoga je neophodna ekstrakcija zaostalih komponenti iz hidrogela kako bi on mogao da se koristi u biomedicinske svrhe. PVA hidrogelovi se mogu dobiti hemijskim umrežavanjem i primenom zračenja i to: i)  $\gamma$  zračenja (Nam i sar., 2004, Park i sar., 2012), ii) UV zračenja (Agabekov i sar.,

2012), iii) elektronskog snopa (Kim i sar., 2008), i iv) mikrotalasnog zračenja (Nadagouda i Varma, 2007). Ovaj način hemijskog umrežavanja je jednostavan i kontrolisan proces, ne zahteva prisustvo hemijskih agenasa kao inicijatora umrežavanja, a istovremeno sa umrežavanjem vrši se i sterilizacija hidrogela. Međutim, glavni nedostatak primene zračenja je stvaranje mehurića unutar hidrogela tokom umrežavanja (Hassan i Peppas, 2000).

Sa druge strane, hidrogelovi PVA se mogu dobiti i fizičkim umrežavanjem i to: i) sušenjem rastvora PVA na visokoj temperaturi, nakon čega sledi njegovo hlađenje (Otsuka i sar., 2009), i ii) ponovljenim ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja vodenih rastvora PVA (Lozinsky i Plieva, 1998, Lozinsky i sar., 2003). Dobijanje hidrogelova fizičkim umrežavanjem ima prednost u odnosu na hemijsko umrežavanje zato što se sa jedne strane izbegava upotreba najčešće toksičnih hemijskih umreživača koji ograničavaju mogućnosti primene u medicini i farmaciji, dok se sa druge strane izbegava stvaranje mehurića u hidrogelu što je slučaj kada se umrežavanje vrši zračenjem (Hassan i Peppas, 2000). Fizički umreženi hidrogelovi metodom ponovljenih ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja nazivaju se i kriogelovi (Lozinsky i sar., 2003). Ovaj proces se objašnjava postupnim zamrzavanjem rastvarača i polimera. Naime, prilikom zamrzavanja rastvora, koji se sastoji od polimera i rastvarača, prvo dolazi do zamrzavanja rastvarača i formiranja kristala. Kristali tokom zamrzavanja rastu sve dok ne dođu u kontakt sa drugim kristalima, tako da će se nakon odmrzavanja kasnije dobiti sistem međusobno povezanih pora, čije dimenzije i oblik zavise od mnogih faktora kao što su broj ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, koncentracija polimera itd. Mali deo ukupne zapremine tečnosti se ne zamrzava i naziva se mikrofaza tečnosti koja ne zamrzava. U mikrofazi koncentracija polimera rapidno raste što dovodi do fizičkog umrežavanja i formiranja gela. Nakon odmrzavanja gel se više ne rastvara tako da je dobijen kriogel sa međusobno povezanim porama. Kriogelovi imaju bolje mehaničke karakteristike od hemijski umreženih hidrogelova.

Na slici 1.7 prikazana je šema formiranja kriogela metodom ponovljenih ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja.

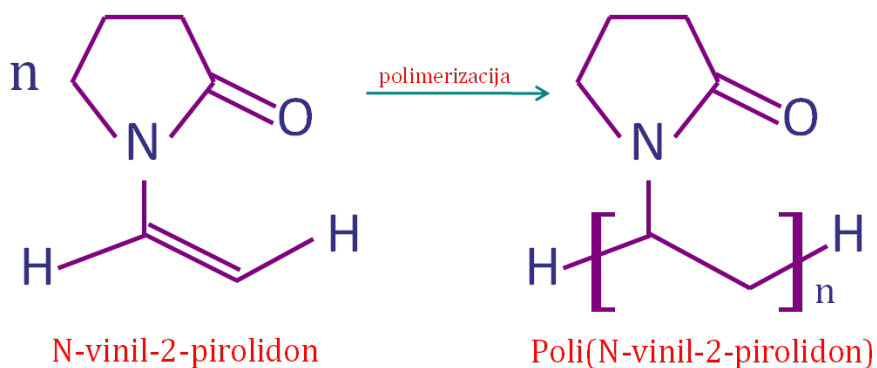


**Slika 1.7.** Šematski prikaz formiranja kriogela metodom ponovljenih ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. A) Početni rastvor se sastoji od makromolekula polimera (1) i rastvarača (2). B) Tokom zamrzavanja stvaraju se kristali rastvarača (3), dok se u mikrofazi tečnosti koja ne zamrzava povećava koncentracija polimera koji se onda fizički umrežavaju (4). C) Nakon odmrzavanja uočava se okosnica kriogela (5), makropore (6) i rastvarač (7) (Lozinsky i sar., 2003)

PVA hidrogelovi se koriste u tekstilnoj industriji, u proizvodnji papira, kao i u industriji za pakovanje hrane (Tripathi i sar, 2009). FDA (Food and Drug Administration) je dozvolila upotrebu PVA u pakovanju hrane, jer su se PVA filmovi pokazali kao odlična barijera za mikroorganizme (DeMerlis i Schoneker, 2003). Hidrogelovi PVA zahvaljujući specifičnim karakteristikama, kao što su visoka mikro- i makro poroznost, biokompatibilnost, netoksičnost, nekancerogenost, otpornost na biodegradaciju, dobre bioadhezivne i biomehaničke karakteristike, imaju potencijalnu primenu u medicini i farmaciji (Hassan i Peppas, 2000, DeMerlis i Schoneker, 2003). PVA hidrogelovi su se pokazali veoma pogodni za imobilizaciju različitih bioaktivnih molekula kao što su lekovi (Peppas i Mongia, 1997, Kayal i Ramanujan, 2010), enzimi (Efremenko i sar., 2002, Bacheva i sar., 2001), faktori rasta (Kawase i sar., 1999), ali i za imobilizaciju različitih mikroorganizama (Lozinsky i sar., 1997, 2003) i ćelija (Bryant i sar., 2004, Vrana i sar., 2008). Takođe, PVA hidrogelovi se primenjuju u zameni oštećene hrskavice i meniskusa (Baker i sar., 2012). Treba istaći da se PVA pokazao kao pogodan polimer za stabilizaciju nanočestica srebra i zlata (Mahapatra i sar., 2007, Sharma i sar., 2009).

### 1.3 POLI(N-VINIL-2-PIROLIDON)

Poli(*N*-vinil-2-pirolidon) ili PVP je sintetički, hidrofilni polimer koji se dobija polimerizacijom monomera *N*-vinil-2-pirolidona (slika 1.8). Poli(*N*-vinil-2-pirolidon) je jedan od najviše korišćenih polimera u medicini zbog svoje rastvorljivosti u vodi i izuzetno niske citotoksičnosti (Razzak i sar., 2001).



**Slika 1.8.** Dobijanje PVP polimerizacijom *N*-vinil-2-pirolidona

Rastvor PVP polimera može da formira hidrogel hemijskim umrežavanjem zračenjem ili pomoću umreživača. Hidrogelovi se najčešće dobijaju zračenjem i to: i) UV zračenjem (Fechine i sar., 2004), i ii)  $\gamma$  zračenjem (Kaplan i Guner, 2000), jer je ovaj način umrežavanja jednostavan, kontrolisan, efikasan i čist. Kao umreživači korišćeni su *N,N'*-meten bis-akrilamid (Bharali i sar., 2003; Wang i Wang, 2010) i glutaralhid (Milosavljević i sar., 2010), ali je nakon geliranja ovom metodom potrebna ekstrakcija ostataka umreživača iz hidrogela. U cilju poboljšanja mehaničkih karakteristika hidrogelova, PVP se često meša sa drugim polimerima kao što su: celuloza (Wang i sar., 2007, Roy i sar., 2012), poli- etilen glikol (Lugao i sar, 2002, Barmpalexis i sar., 2013) ili PVA (Joshi i sar., 2006, Thomas i sar., 2009, Ma i sar., 2009).

PVP hidrogelovi su zbog svoje biokompatibilnosti, mekoće i elastičnosti, sposobnosti da apsorbuju veliku količinu tečnosti uz zadržavanje mehaničkih karakteristika veoma pogodni za primenu u medicini i farmaciji. PVP hidrogelovi su ispitivani za imobilizaciju lekova (Rosiak i sar., 1993, Shalaby i sar., 1991, Lopes i Felisberti, 2003, Bharali i sar., 2003), a korišćeni su i kao komponente obloga za

rane (*Rosiak i sar., 1993, Benamer i sar., 2006*). Takođe, PVP hidrogel u kombinaciji sa PVA se pokazao kao pogodan materijal za potencijalnu zamenu intervertebralnog diska i to *nucleus pulposus* (*Joshi i sar., 2006, Ma i sar., 2009*), kao i hrskavice (*Zheng i sar., 2009*).

Treba istaći da je PVP pogodan za imobilizaciju metalnih nanočestica, zbog snažnog afiniteta piridil-grupe ka metalima (*Wang i sar., 2006*).

#### 1.4 NANOČESTICE SREBRA

Nanotehnologija je multidisciplinarna oblast u kojoj se primenjuju znanja prirodnih nauka i inženjerski principi sa ciljem da se dobiju, okarakterišu i primene materijali veličine nanometra (*Ramsden, 2014*). Materijali nanodimenzija imaju specifične karakteristike. Kada se broj atoma koji čine materijal znatno smanji, atomi zauzimaju drugačiji raspored i menja se međurastojanje za površinske atome, što dovodi do promene fizičkih i hemijskih karakteristika u odnosu na materijale istog sastava, ali makroskopskih dimenzija (*Trajković i Marković, 2010*).

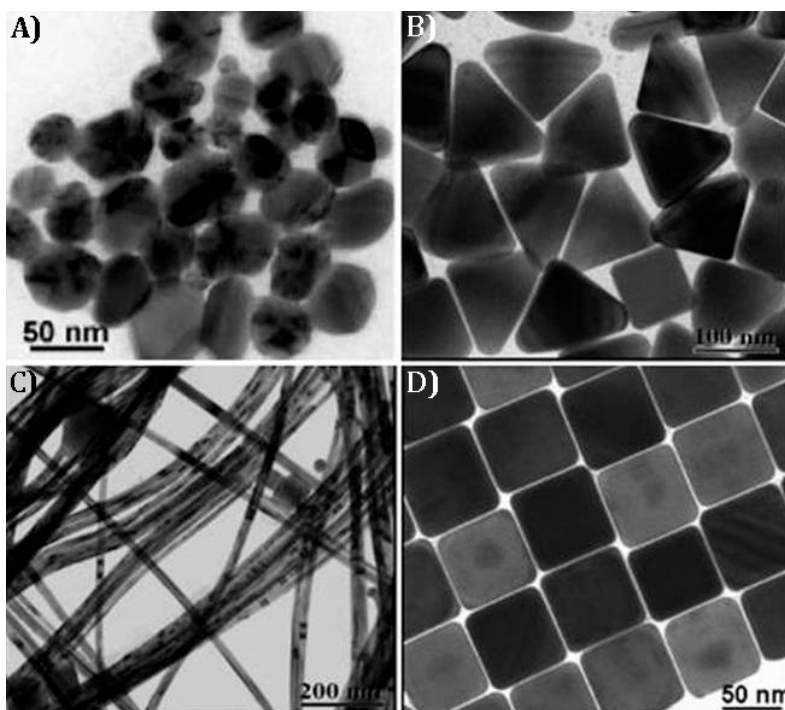
Poslednjih nekoliko decenija, metalne nanočestice su fokus istraživanja mnogih istraživačkih grupa. Veličina metalnih nanočestica se kreće u opsegu od 1 do 100 nm. Nanočestice, zahvaljujući velikoj specifičnoj površini u odnosu na zapreminu, kao i velikoj površinskoj energiji, imaju jedinstvene katalitičke, električne, magnetne, optičke i mehaničke karakteristike (*Horikoshi i Serpone, 2013*).

Nanočestice srebra su zbog svojih katalitičkih (*Jiang i sar., 2005, Saha i sar., 2010*), i optičkih (*McFarland i Duyne, 2003*) osobina, kao i antimikrobne aktivnosti (*Bhattacharya i Mukherjee, 2008*) privukle pažnju mnogih istraživačkih grupa. Nanočestice srebra se mogu dobiti različitim metodama: i) hemijskom redukcijom jona srebra i to u vodenim rastvorima (*Leopold i Len, 2003, Caswell i sar., 2003, Chaki i sar., 2004*), kao i u ne-vodenim rastvorima (*Chen i Huan, 2002, Wang i sar., 2003*), ii) metodom po modli (*Faure i sar., 2003*), iii) elektrohemijском metodom



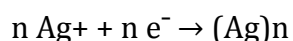
(*Johans i sar., 2004*), iv) redukcijom jona srebra pomoću ultrazvuka (*Zhang i sar., 2004*), v) redukcijom indukovanom ili katalizovanom fotohemijskim putem (*Shchukin i sar., 2003, Zhang i sar., 2003, Cozzoli i sar., 2004*), vi) sintezom indukovanom mikrotalasima (*Komarneni i sar., 2002, Yamamoto i sar., 2004*), vii) radijaciono-hemijskom redukcijom (*Hornebecq i sar., 2003, Lihui i sar., 2004*), viii) mikroemulzionom metodom (*Zheng i sar., 2003 i 2004, Maillard i sar., 2002 i 2003*), i ix) biohemijskom redukcijom jona srebra (*Naik i sar., 2002, Bhainsa i D'Souza, 2006*). Takođe, nanočestice srebra se mogu sintetisati u hidrogelovima, bubrenjem hidrogelova u rastvorima  $\text{Ag}^+$  jona i naknadnom redukcijom jona srebra. Redukcija  $\text{Ag}^+$  jona se može vršiti na različite načine: hemijski (*Mohan i sar., 2007, Thomas i sar., 2007*), UV zracima (*Lu i sar., 2007*), radijaciono-hemijski (*Xiang i Chen, 2007*) i elektrohemijski (*Jovanović i sar., 2014*).

U zavisnosti od uslova sinteze nanočestice mogu biti različite veličine i oblika (*Yu i Yam, 2005, Sharma i sar., 2009, Mochochoko i sar. 2013*). Na slici 1.9 su prikazane nanočestice srebra različitih oblika.



**Slika 1.9.** TEM mikrografije nanočestica srebra različitih oblika: A) sferične nanočestice (*Pal i sar., 2007*); B) trouglaste nanočestice; C) nanožice; D) kockaste nanočestice (*Yu i Yam, 2005*)

Ritc (*Reetz*) i Helbig (*Helbig*) su prvi pokazali da se nanočestice prelaznih metala određene veličine mogu dobiti elektrohemijom putem (*Reetz i Helbig, 1994*). Elektrohemijsko dobijanje nanočestica srebra podrazumeva elektrohemijsku redukciju jednovalentnih jona srebra pomoću električne struje. Ovaj proces se može predstaviti sledećom jednačinom:



Elektrohemijska sinteza nanočestica srebra pokazuje prednosti u odnosu na ostale metode sinteze nanočestica i kao što su: i) visoka čistoća metalnih čestica, što je posebno značajno kod biomedicinske primene, i ii) mogućnost precizne kontrole veličine čestica, koja se postiže podešavanjem vrednosti potencijala ili gustine struje koja se koristi za sintezu nanočestica (*Rodríguez-Sánchez i sar., 2000*).

Osnovni problem primene nanočestica srebra jeste velika tendencija ka aglomeraciji što umanjuje odnos površine i zapremine, a time se menjaju i svojstva nanočestica. U cilju stabilizacije nanočestica, tj. prevencije njihove aglomeracije, mogu se koristiti polimeri. Od prirodnih polimera najčešće je korišćen skrob (*Chairam Somsook, 2008, Chairam i sar., i 2009*), dekstran (*Berry i sar., 2003*) i hitozan (*Park i sar., 2005*), a od sintetičkih polimera, zbog biokompatibilnosti, koriste se PVP, PVA, poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) i poli(metil metakrilat) (PMMA) (*Stasica i sar., 2000, Darwis i sar., 2002*). Stabilizacija nanočestica srebra pomoću rastvora polimera se objašnjava elektronskim interakcijama funkcionalnih grupa polimera i nanočestica metala. Nukleofilni karakter funkcionalnih grupa polimera je dovoljno izražen da bi se nanočestice metala vezale donorskim elektronima (*Henglein, 1993*). Takođe, polimeri mogu da stvore koordinativne veze sa jonima metala, formirajući kompleks polimer/metalni jon, koji se lako može redukovati. Takav redukovani kompleks sadrži čestice metala manjih dimenzija i uže raspodele veličina (*Esumi i sar., 1998*). Nakon redukcije, efekat stabilizacije se može objasniti na dva načina: vezivanjem nanočestica za polimer ili inkapsulacijom nanočestica metala unutar strukture polimera (*Kuo i Che, 2003*). Alginat, PVA i PVP su najčešće ispitivani polimeri za

biomedicinsku primenu, ali i za stabilizaciju nanočestica srebra (*Sharma i sar., 2009, Armentano i sar., 2010*).

Nanočestice srebra su sintetisane u alginatnim rastvorima hemijskom redukcijom jona srebra iz rastvora soli (kao što je srebro sulfat i srebro nitrat) pomoću borhidrata ili askorbinske kiseline kao redukujućih agenasa (*Dubas i Pimpan, 2008, Travan i sar., 2009, Seo i sar., 2012, Marie Arockianathan i sar., 2012*),  $\gamma$  zračenjem (*Liu i sar., 2009*) i fotohemijском redukcijom (*Saha i sar., 2009*). Takođe, jednostavnim metodom zagrevanja rastvora  $\text{AgNO}_3$  (4,0 M) i alginata (0,2 mas.%) na temperaturi od 90 °C nakon 1 h su dobijene sferične nanočestice srebra prečnika  $14 \pm 3$  nm, gde je alginat služio i kao redukujući agens i stabilizator nanočestica (*Sharma i sar., 2012*). Isto tako, nanočestice srebra se mogu sintetisati i unutar alginatnog hidrogela fotohemijском redukcijom (*Ai i sar., 2012*).

Vodeni rastvori, kao i hidrogelovi PVA, su se takođe pokazali veoma pogodni za sintezu nanočestica srebra (*Sharma i sar., 2009*). Tako su primenom elektronskog snopa (5–15 keV) na vodeni rastvor 0,01 M  $\text{AgNO}_3$  i PVA dobijene nanočestice srebra prečnika 40-150 nm, pri čemu su manje nanočestice dobijene kada je energija elektrona veća (*Mahapatra i sar., 2007*). Takođe, nanočestice srebra su sintetisane hemijskom redukcijom jona srebra u vodenom rastvoru PVA pomoću redukujućeg agensa hidrazin hidrata, kao i natrijum-formaldehidsulfoksilata (*Khanna i sar., 2005*). Pokazano je da se nanočestice srebra mogu sintetisati unutar PVA filma hemijskom redukcijom pomoću natrijum borhidrata kao redukujućeg agensa (*Clemenson i sar., 2008*), zatim fotohemijском redukcijom (*Korchev i sar., 2006, Clemenson i sar., 2008*), kao i zagrevanjem rastvora na temperaturi većoj od 90°C (*Clemenson i sar., 2007, Clemenson i sar., 2008*). Fotohemijска redukcija je takođe korišćena za dobijanje nanočestica unutar PVA nanovlakana (*Hong i sar., 2006*).

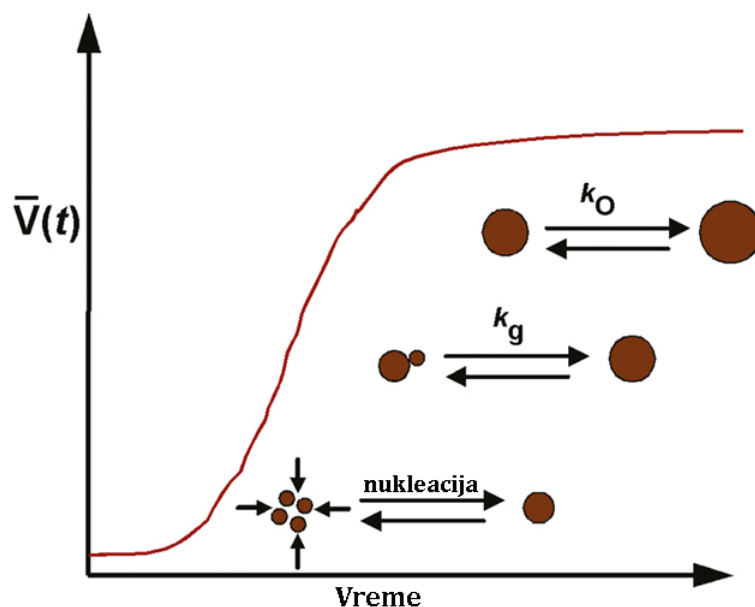
Nanočestice srebra su uspešno sintetisane u vodenim rastvorima PVP različitim metodama kao što su: i) hemijska redukcija (*Wang i sar., 2005*), ii) elektrohemijска redukcija (*Yin i sar., 2003*), iii) UV zračenje (*Yang i Lu, 2005*), iv)  $\gamma$  zračenje (*Shin i sar., 2004*), v) sinteza indukovana mikrotalasima (*Pai i sar.,*

2009), i vi) sinteza indukovana ultrazvukom (*Jiang i sar., 2004*), kao i unutar PVP hidrogelova  $\gamma$  zračenjem (*Jovanović i sar., 2011*) i elektrohemijom redukcijom (*Jovanović i sar., 2013*).

Za biomedicinsku primenu se kao atraktivan agens pokazao med, koji istovremeno redukuje srebro i stabilizuje nanočestice srebra (*Philip, 2010*). Med se koristi u medicinske svrhe od davnina zbog svog sastava i specifičnih karakteristika. Med se sastoji od različitih ugljenih hidrata (>80 %), pri čemu su najzastupljeniji fruktoza i glukoza čineći udeo od oko 70 %, dok je saharoza (stoni šećer) zastupljena ~5 %. Ostatak je voda oko 20 %, dok su proteini zastupljeni u malom procentu oko 0,3 % (*Jull i sar., 2008*). Prilikom sinteze nanočestica srebra u medu glukoza služi za redukciju srebra, a proteini meda za stabilizaciju nanočestica (*Philip, 2010*). Da bi redukcija srebra počela neophodno je prisustvo natrijum hidroksida koji olakšava otvaranje glukoznog prstena što omogućava jonima srebra da oksiduju glukozu do glukonske kiseline (*Raveendran i sar., 2006*). Tokom ove hemijske reakcije nastaju nanočestice srebra i glukonska kiselina, a sve ostale komponente meda ostaju nepromenjene. Takođe, je pokazano da što je viša pH vrednost (odnosno pri većim koncentracijama natrijum hidroksida) to se stvara veći broj veoma malih nanočestica ~4 nm (*Philip, 2010*).

#### 1.4.1 MEHANIZAM RASTA NANOČESTICA SREBRA

Opšti mehanizam formiranja i rasta nanočestica srebra se sastoji od nekoliko faza: i) klasična nukleacija i rast, ii) agregativna nukleacija i rast, i iii) Ostvaldovo sazrevanje (*Richards i sar, 2010*). Kinetika rasta nanočestica se najčešće prikazuje sigmoidalnim profilom (slika 1.10) (*Skrdla i Robertson, 2008, Richards i sar, 2010*).



**Slika 1.10.** Šematski prikaz mehanizma formiranja i rasta nanočestica srebra u toku vremena. Najmanji krugovi predstavljaju primarne nanokristale, dok najveći označavaju rastuće nanočestice.  $\bar{V}(t)$  je srednja zapremina nanočestica u toku vremena,  $k_g$  je konstanta agregacionog rasta,  $k_0$  je konstanta brzine Ostvaldovog sazrevanja (Richards i sar, 2010)

Mehanizam formiranja i rasta nanočestica se može opisati modifikovanom Kolmogorov- Džonson-Mel-Avramijevom jednačinom (Kolmogorov-Johnson-Mehl-Avrami) - KJMA koja pored nukleacije i aktivnog rasta uključuje i Ostvaldovo sazrevanje (Richards i sar, 2010):

$$\frac{\bar{V}(t)}{\bar{V}_{\text{lim}}} = 1 - \exp(-(k_g t)^n) + \left| \frac{t - \tau_0}{1 + \exp(-2\omega(t - \tau_0))} \right| k_0 \quad (1.9)$$

gde je  $\bar{V}(t)$  srednja zapremina nanočestica i  $\bar{V}_{\text{lim}}$  limitirajuća srednja zapremina na kraju perioda aktivnog rasta. Jednačina sadrži standardni KJMA član koji opisuje nukleaciju i aktivan rast nanočestica gde je  $k_g$  konstanta agregacionog rasta, a  $n$  Avramijev eksponent (Shields i sar., 2010). Drugi član u jednačini opisuje Ostvaldovo sazrevanje koje počinje posle inicijalnog perioda  $\tau_0$  uz konstantu brzine Ostvaldovog sazrevanja  $k_0$  i konstantu  $\omega$ . Predviđanja modela su pokazala

kvalitativno i kvantitativno dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima (Richards i sar, 2010).

#### 1.4.2 ANTIMIKROBNA SVOJSTVA NANOČESTICA SREBRA

Antimikrobne karakteristike srebra su već vekovima poznate. Tako je posuđe od srebra korišćeno za čuvanje vode, dok su jedinjenja koja sadrže srebro korišćena u tradicionalnoj medicini (Slawson i sar., 1992, Bhattacharya i Mukherjee, 2008, Armentano i sar., 2010). U poslednjih nekoliko decenija, zabeležen je značajan porast mikroorganizama koji su rezistentni na postojeće antibiotike što je vratilo srebro u medicinsku primenu (Monteiro i sar., 2009). Danas postoje različiti proizvodi koji u sebi sadrže srebro kao što su antimikrobne obloge za rane, masti i premazi i koji se najčešće koriste u tretmanu inficiranih opekotina, otvorenih rana i hroničnih ulkusa (Travan i sar., 2009, Dubas i sar., 2011).

Pokazano je da nanočestice imaju veću antimikrobnu aktivnost od jona srebra (Lok i sar., 2006). Nanočestice deluju na nivou ćelijske (citoplazmatične) membrane tako što interaguju sa strukturnim proteinima menjajući permeabilnost membrane, zatim sa membranskim enzimima inhibirajući njihovu aktivnost (Li i sar., 2010). Nanočestice takođe penetrišu u ćeliju interagujući sa DNK, što utiče na sposobnost replikacije ćelije (Morones i sar., 2005). Pri tome se nanočestice i rastvaraju oslobađajući jone srebra koji takođe deluju antimikrobno (Morones i sar., 2005). Pokazano je da nanočestice srebra deluju na različite viruse (Xiang i sar., 2011), bakterije (Guzman i sar., 2012, Radzig i sar., 2013), i gljive (Panáček i sar., 2009). Hemijski sintetisane nanočestice srebra u rastvorima različitih saharida su pokazale antibakterijsku aktivnost prema 10 različitih vrsta bakterija, pri čemu su najmanje nanočestice u ovoj studiji prečnika 25 nm bile najefikasnije, dok su najveće nanočestice prečnika 50 nm imale najslabiju antimikrobnu aktivnost (Panáček i sar. 2006). Takođe je pokazano da oblik nanočestica značajno utiče na antimikrobnu aktivnost (Pal i sar., 2007). Pri ispitivanju antimikrobne aktivnosti nanočestica srebra različitih oblika (štapičaste, sferične i trouglaste nanočestice) prema *E. coli* ATCC 10536 pokazano je da su najefikasnije nanočestice

trouglastog oblika, dok su nanočestice štapićastog oblika imale najslabiju antimikrobnu efikasnost.

Nanočestice srebra se već komercijalno koriste za obloge za rane (*Acticoat, Smith&Nephew, SAD*), ali imaju potencijalnu primenu za antimikrobne kreme i gelove (*Jain i sar, 2009*), kao i za prevlake za katetere, drenove i implante (*Knetsch i Koole, 2011*).

Nanočestice srebra su takođe zbog svoje snažne antimikrobne aktivnosti veoma atraktivne komponente za poboljšanje funkcionalnosti membrana za tretman otpadnih voda, kao i filtera za vodu (*Jain i Pradeep, 2005, Kim i der Bruggen, 2010*). Međutim, glavni problem primene nanočestica srebra je njihovo brzo otpuštanje sa površine polimera od kojeg su membrane napravljene (*Tseng i sar., 2006*), pa je koncentracija srebra u filtriranoj vodi iznad dozvoljene koncentracije od 0,1 mg/l po EPA standardu (*Environmental Protection Agency – EPA*). Stoga se funkcionalnost membrana poboljšava imobilizacijom nanočestice srebra unutar vlakana polimera od kojih je membrana napravljena (*Van Phu i sar., 2013*). Na taj način se mali procenat nanočestica otpusti iz polimera u filtriranu vodu, a antimikrobna aktivnost ostaje nepromenjena (*Phu i sar., 2013*).

## 1.5 BIOMEDICINSKA PRIMENA HIDROGELOVA

### 1.5.1 INŽENJERSTVO TKIVA

Inženjerstvo tkiva je multidisciplinarna oblast u kojoj se primenjuju znanja prirodnih nauka i inženjerski principi sa ciljem da se *in vitro* gaje funkcionalna tkiva i organi za potencijalnu kliničku upotrebu (*Langer i Vacanti, 1993*). Danas postoji velika potreba za transplantacijom tkiva i organa, a jedan od glavnih problema je mali broj raspoloživih donora (*Nerem, 2000*). Takođe, transplantacija tkiva ili organa najčešće dovodi do imunskog odgovora organizma, tako da je neophodna doživotna imunosupresivna terapija kod pacijenata kojima je izvršena transplantacija. Uz to transplantacija nosi rizik mogućnosti prenosa raznih bolesti putem transplantovanog tkiva i organa. Inženjerstvo tkiva nastoji da reši ove

probleme *in vitro* gajenjem funkcionalnog tkiva, koje treba da po sastavu, morfologiji i strukturi odgovara prirodnom tkivu, kao i da se integriše u okolno tkivo i ostvari normalnu funkciju po implantaciji. Tkiva dobijena u *in vitro* uslovima takođe, mogu da predstavljaju relevantne fiziološke modele za kontrolisane *in vitro* studije procesa razvoja tkiva i uticaja različitih fizičko-hemijskih faktora u normalnim i patološkim uslovima (*Freed i Vunjak-Novaković, 2000*). Regeneracija tkiva u *in vitro* uslovima se može postići integrisanom primenom izolovanih ćelija, nosača od biomaterijala i biorektorskih sistema. Ovaj pristup je po svojoj prirodi biomimičan pri čemu su nosači ćelija sintetisani i oblikovani tako da obezbede trodimenzionalnu mikrosredinu za pričvršćivanje i diferenciranje ćelija, dok bioreaktori treba da obezbede stacionarne uslove gajenja i sve neophodne biohemijske i biofizičke faktore za brzu i uniformnu regeneraciju funkcionalnog matriksa tkiva. Generalno se pretpostavlja da će ćelije regenerisati funkcionalno tkivo pod uslovima koji imitiraju prirodnu *in vivo* sredinu (*Nerem, 2000*).

#### 1.5.1.1 HRSKAVICA I KOSTI

Skeletna tkiva imaju ulogu da prime i prenesu opterećenje prilikom pomeranja tela. Hrskavica i kost, kao glavne komponente skeleta, imaju različit sastav, strukturu i funkciju.

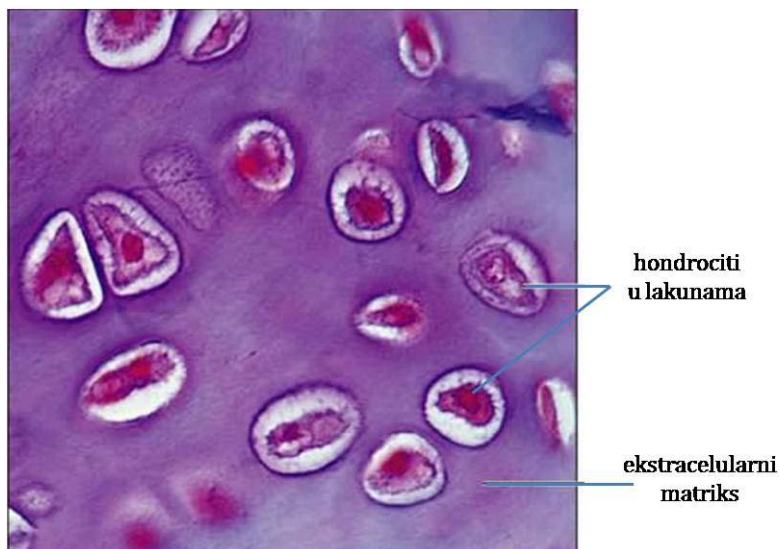
**Hrskavica** je avaskularno, alimfatično i aneuralno potporno tkivo koje se sastoji od jednog tipa ćelija hondrocita i visoko specijalizovanog vanćelijskog matriksa. U odraslom organizmu hrskavica je prisutna u zglobovima i u onim delovima dugih kostiju koji omogućavaju njihovo izduživanje, zatim između kičmenih pršljenova, u delu skeleta grudnog koša, a predstavlja i skeletnu potporu ušne školjke, nosa i nekih delova disajnih puteva. Na osnovu razlika u strukturi i biohemijskom sastavu vanćelijskog matriksa, a samim tim i u mehaničkim svojstvima, u organizmu se razlikuju tri tipa hrskavičavog tkiva: hijalinska, elastična i fibrozna hrskavica (*Netti i sar., 2002, Schulz i sar., 2007*).



Artikularna hrskavica je specijalizovana forma hijalinske hrskavice koja se nalazi u sinovijalnim zglobovima gornjih i donjih ekstremiteta (*Mow i sar., 1992, Cowin i sar., 2007*). Unutar zgloba se nalaze zglobne površine kostiju pokrivene tankim slojem artikularne hrskavice (debljine, 0,5 – 5 mm), dok se između artikularnih hrskavica nalazi zglobna šupljina ispunjena veoma viskoznom sinovijalnim fluidom. Artikularna hrskavica poseduje neverovatnu čvrstinu i otpornost na kompresiju, bez obzira na malu debljinu (*Buckwalter i Manki, 1997, Cowin i sar., 2007*). Površine artikularne hrskavice su izložene direktnoj kompresiji, smicajnim silama i hidrostatičkom pritisku (*Darling i Kyriaco, 2003*). Glavni biomehanički zadatak artikularne hrskavice je da rasporedi teret između zglobnih površina (*Netti i sar., 2002*) i prenese opterećenje na distalne delove kostiju, da bi se smanjio pritisak koji se vrši na površine artikularne hrskavice. Pod normalnim okolnostima opterećenje kojem su zglobovi izloženi je uglavnom ciklično i/ili periodično. Mnoge studije su pokazale da hrskavica u normalnim okolnostima pri dnevnim aktivnostima trpi veoma visoka opterećenja koja se kreću i do 18 MPa npr. u zglobu kuka prilikom ustajanja sa stolice (*Mow i sar., 1992, Ateshian i sar., 2003*). Zahvaljujući sinovijalnom fluidu, koji je prisutan u zglobnoj šupljini, omogućava se pokretanje zglobnih površina kostiju uz minimalno trenje. Koeficijent frikcije artikularne hrskavice se kreće u opsegu 0,002 – 0,04 (*Mow i sar., 1992, Cowin i sar., 2007*), dok npr. koeficijent frikcije između dve površine čelika iznosi 0,6, između dve površine stakla 0,9, a između dve površine leda na 0 °C u opsegu 0,01 – 0,1 (*Mow i sar., 1992, Cowin i sar., 2007*). Na osnovu navedenih vrednosti koeficijenata trenja može se slobodno reći da je stepen trenja između zglobnih površina sinovijalnog zgloba tokom pokreta ekstremno nizak.

Artikularna hijalinska hrskavica se sastoji od ekstracelularnog matriksa (ECM) i ćelija hondrocita koji se nalaze u malim „šupljinama“ koje se zovu lakune (slika 1.11). Ćelije kod ljudi čine svega oko 1 % zapremine tkiva što hrskavicu čini tkivom koje ima najmanju ćelijsku gustinu u organizmu (*Buckwalter i Manki, 1997, Schulz i sar., 2007*). Ekstracelularni matriks artikularne hrskavice se sastoji od dve faze: tkivne tečnosti i strukturnih makromolekula. Strukturne makromolekule hrskavice čine kolagen, proteoglikani i specifični nekolageni proteini. Ovi molekuli

predstavljaju oko 20–40 % vlažne mase tkiva. Kolagen čini oko 60 % suve mase hrskavice, proteoglikani 25–35 %, a nekolageni proteini i glikoproteini 15–20 % suve mase (*Dijkgraaf i sar., 1995, Buckwalter i Manki, 1997, Temenoff i Mikos, 2000*). U artikularnoj hrskavici se nalazi više tipova kolagenih vlakana, od čega 90–95% čine kolagena vlakna tipa II.



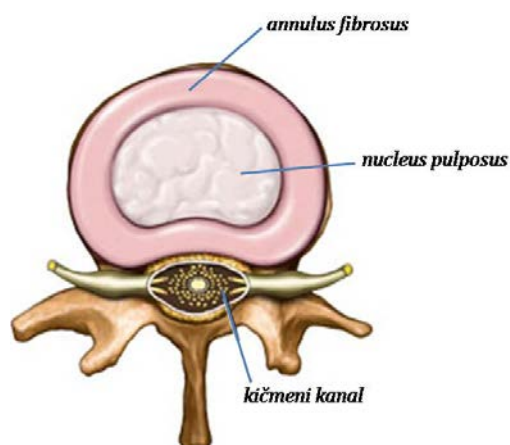
**Slika 1.11.** Hondrociti u lakunama okruženi ekstracelularnim matriksom

**Intervertebralni diskovi (IVD)** čine hrskavičavi deo kičmenog stuba čiji je glavni biomehanički zadatak da prenosi opterećenje i omogući fleksibilnost kičme (*Huwkins, 1988*). Mnoge studije su pokazale da intervertebralni diskovi u normalnim okolnostima pri dnevnim aktivnostima trpe veoma visoka opterećenja koja se kreću i do 1,3 MPa npr. pri sedenju sa maksimalnim istezanjem, i prilikom ustajanja sa stolice (*Wilke i sar., 1999, Sato i sar., 1999*).

Degenerativne promene diska kao što su diskus hernija (*discus hernia*), radikulopatija, mijelopatija i druge su često povezane sa starenjem, usled smanjenja visine diska, i snižavanja koncentracije proteoglikana i sadržaja vode (*Adams i Roughley, 2006*). Svakodnevno mehaničko opterećenje koje deluje na IVD generiše biofizičke signale koji podstiču ćelije da obavljaju svoju funkciju i omogućavaju fiziološku ulogu diska, pa se stoga mehaničko opterećenje smatra posebno važnim za održavanje zdravog IVD. Sa druge strane, iako je mehaničko opterećenje poželjno za održavanje zdravlja i pravilnog funkcionisanja IVD,

prevelika dinamička opterećenja van fizioloških opsega, izazivaju degenerativne promene.

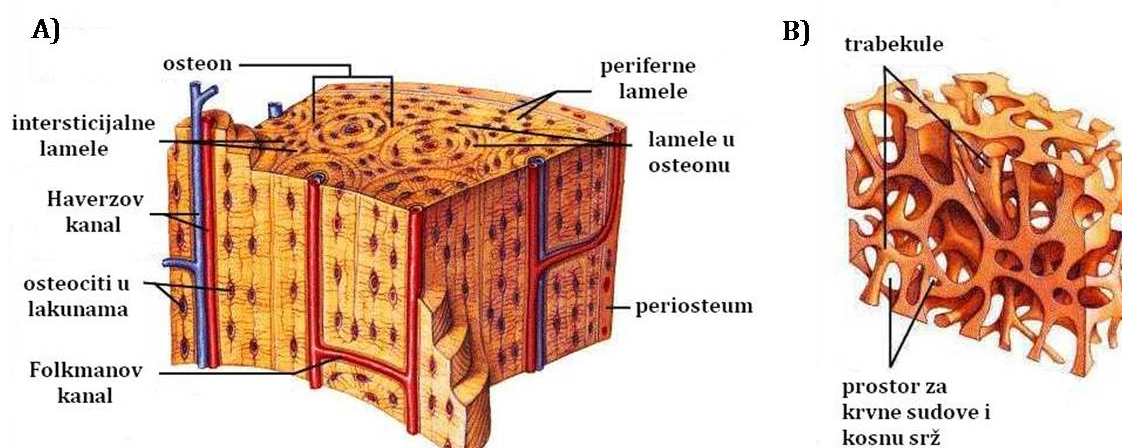
Intervertebralni disk se sastoji od: i) fibroznog prstena (*annulus fibrosus*), koji daje čvrstinu, i ii) želatinoznog jezgra (*nucleus pulposus*) koji amortizuje stres i deformacije koje trpe pršljenovi prilikom različitih pokreta tela (slika 1.12). *Annulus fibrosus* se sastoji od koncentričnih lamela izgrađenih od fibrozne hrskavice. Unutar svake lamele vlakna su paralelno postavljena. *Annulus fibrosus* sadrži kolagen tipa I i II, proteoglikane i elastin, kao i vodu (60-70 % mase *annulus fibrosus*). Najveći procenat kolagena tipa I je na periferiji *annulus fibrosus*, dok koncentracija kolagena tipa II raste od periferije ka jezgru. Proteoglikani su smešteni između kolagenih vlakana lamela i njihova uloga je da ih drže zajedno. *Nucleus pulposus* ima visok sadržaj vode od oko 80 %, koja apsorbuje opterećenje u kičmi i prenosi ga na okolna tkiva. Zbog visokog procenta vode *nucleus* je po svojoj strukturi sličan gelu (Darwis, 2002). Proteoglikani čine do 65 % suve mase *nucleus pulposus*, i njihovo negativno naelektrisanje privlači i zadržava vodu, što utiče na stvaranje visokog osmotskog pritiska unutar jezgra (Urban, 1993). Kolagen tipa II čini 5-20 % suve mase i drži proteoglikanske agregate zajedno. Takođe, u jezgru (*nucleus*) su prisutna i elastična vlakna, kao i nekolageni proteini.



**Slika 1.12.** Intervertebralni disk, izgrađen od unutrašnjeg dela *nucleus pulposus* ili jezgro, i spoljašnjeg dela-*annulus fibrosus* - fibrozni prsten, sa kičmenim kanalom

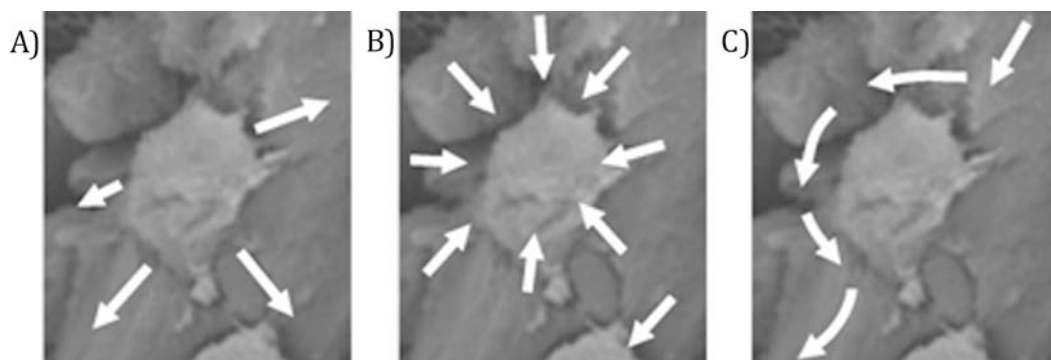
**Kost** je dinamičko, visoko vaskularizovano tkivo sa metabolički aktivnim ćelijama. Kostu daju oblik i mehaničku potporu telu, zajedno sa mišićima olakšavaju kretanje i štite vitalne organe u kranijalnoj i torakalnoj duplji. U nekim kostima smeštena je kostna srž, izvorište krvnih ćelija i ćelijskih elemenata limfoidnog tkiva. Pored toga koštano tkivo predstavlja rezervoar jona kalcijuma i fosfora, ali i drugih jona. Tkivo kosti pripada grupi vezivnih tkiva, i izgrađeno je od tri tipa ćelija koje su okružene ekstracelularnim matriksom. Osteoblasti su delimično diferencirane, pokretne ćelije koje sintetišu sve komponente ekstracelularnog matriksa (kolagene i nekolagene proteine). Sintetisane komponente ECM bivaju sekretovane u ekstracelularni prostor i tek onda dolazi do mineralizacije. Neminerlizovan matriks koji naleže na površinu osteoblasta i uz površinu matriksa kosti naziva se osteoid. Osteociti su diferencirani osteoblasti i predstavljaju najbrojnije ćelije kosti. Osteoklasti su višejedarne, pokretne ćelije i ne potiču od osteoprogenitorskih ćelija kao što je to slučaj sa osteoblastima i osteocitima već su hematopoetskog porekla. One imaju jedinstvenu sposobnost da razlažu mineralizovani matriks kosti (*Meyer i Wiesmann, 2006*). Ekstracelularni matriks kosti je izgrađen 50 % od organskih komponentata (~ 95 % kolagena i to pretežno kolagen tip I, a preostalih 5 % čine proteoglikan, glikoproteini i različiti nekolageni proteini npr. osteoponin, osteokalcin itd.) i 50 % neorganskih komponentata (kristali hidroksiapatita i amorfni kalcijum-fosfat). Tkivo kosti, u zavisnosti od njegove histološke organizacije, može biti kompaktno ili sponozasto tkivo (slika 1.13). Kompaktno tkivo je izgrađeno od osteona. Osteon čine koncentrično raspoređene lamele, obrazovane od matriksa kosti, između kojih se nalaze kružno raspoređeni osteociti čiji se citoplazmatski nastavci pružaju kroz kanalikle do centralnog Haverzovog kanala u kojem su smešteni krvni sudovi, limfni sudovi i ogranci nerava (*Meyer i Wiesmann, 2006*). Između osteocita mestimično se mogu zapaziti osteoklasti, čiji broj zavisi od starosti organizma tako da sa starošću broj osteoklasta opada. Osteoni su međusobno povezani sistemom kanala koji se nazivaju Folkmanovi (*Volkman*) kanali kroz koje prolaze krvni i limfni sudovi, kao i nervni završeci. Sponozasto tkivo kosti je organizovano kao porozni sponder (slika 1.13B). Ono se sastoji od tankih ploča nepravilnog oblika koje se nazivaju trabekule. Između trabekula nalazi se prostor unutar koga su

smešteni krvni sudovi i kostna srž. Trabekule su slične osteonima, jer imaju osteocite u lakunama koje leže između kalcifikovanih lamela. Kao i osteoni, trabekule imaju male kanale koji povezuju osteocite. Međutim, trabekula je debela svega nekoliko ćelijskih slojeva, tako da je svaki osteocit u mogućnosti da razmeni nutrijente sa najbližom krvnom vezikulom, pa centralni kanal nije neophodan (Meyer i Wiesmann, 2006).



**Slika 1.13.** Prikaz organizacije tkiva kosti: A) kompaktno tkivo kosti, B) i sunderasto tkivo kosti

Iako se tkivo hrskavice i kosti razlikuju po svom sastavu, strukturi i funkciji, oba tkiva imaju potrebu za visokim mehaničkim opterećenjem koje izaziva različite biofizičke signale u tkivu, a oni utiču na metaboličku aktivnost ćelija koje sintetišu i deponuju ekstracelularni matriks. Matriks obezbeđuje adekvatne biomehaničke karakteristike. Prilikom opterećenja tkiva ćelije su izložene deformaciji, hidrostatičkom pritisku i tangencijalnom naponu (slika 1.14, Raimondi, 2006). Kao odgovor na mehaničko opterećenje ćelije menjaju svoju metaboličku aktivnost i time sastav ekstracelularnog matriksa što ukazuje da su odgovarajući fizički signali ključni faktori za normalnu strukturu i funkciju tkiva.



**Slika 1.14.** Ćelije su izložene različitim fizičkim signalima usled mehaničkog opterećenja tkiva. A) Istezanjem ili kompresijom matriksa tkiva fizički signali se prenose do ćelija preko mesta adhezije ćelija i matriksa. B) Usled porasta pritiska intersticijalne tečnosti tkiva ćelije su izložene hidrostatičkom pritisku. C) Usled proticanja intersticijalne tečnosti tkiva na ćelijsku membranu deluje hidrodinamički tangencijalni napon (*Raimondi, 2006*)

Artikularna hrskavica je u normalnim uslovima izložena direktnoj kompresiji, što dovodi do deformacije tkiva i izlaska intersticijalnog fluida iz ekstracelularnog matriksa. Međutim, negativno naelektrisani proteoglikani se suprotstavljaju proticanju fluida što dovodi do porasta pritiska intersticijalnog fluida. Smatra se da je manje od 10 % opterećenja koje trpe ćelije, uzrokovano čvrstom fazom ekstracelularnog matriksa, dok je ostatak posledica porasta pritiska intersticijalnog fluida. Stoga, je hidrostatički pritisak jedno od važnih opterećenja u artikularnoj hrskavici zglobova (*Schulz and Bader, 2007*). Takođe, treba dodati da kretanje fluida tokom pokretanja zgloba indukuje tangencijalne napone u hrskavici (*Schulz and Bader, 2007*).

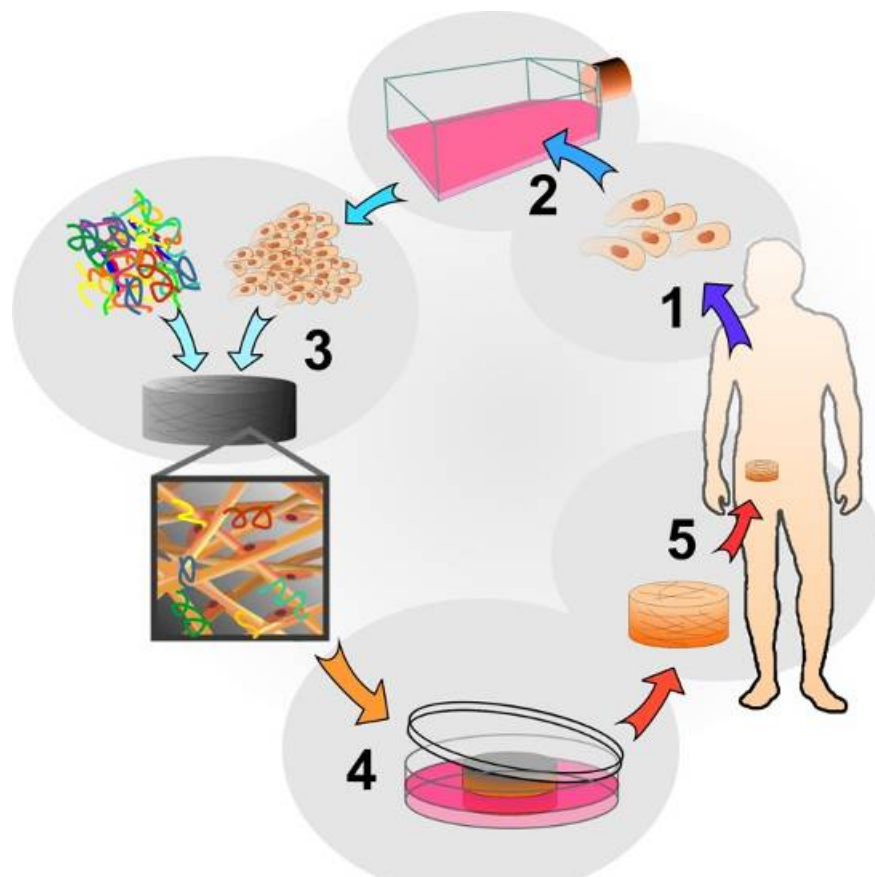
Slično artikularnoj hrskavici, IVD je takođe dominantno izložen kompresiji. Pod visokim opterećenjem u *nucleus fibrosus* (*Raimondi, 2006*) tečnost polako biva istisnuta iz diska što dovodi do povećanja koncentracije proteoglikana, a samim tim i gustine negativnog naelektrisanja što za posledicu ima povećanje osmolariteta i smanjenje pH vrednosti (*Urban, 1993*). Povećanje koncentracije jona unutar *nucleus* utiče na osmozu vode iz ćelije u intersticijalni prstor, što izaziva smanjenje zapremine ćelija, i utiče na transport jona kroz ćelijsku membranu i dovodi do promene u biosintetičkim funkcijama ćelija (*Hall, 1995*).

Koštano tkivo je izloženo različitim opterećenjima tokom normalnih dnevnih aktivnosti tako da produženo odsustvo mehaničke stimulacije može da dovede do značajnog smanjenja mineralnog sastava i čvrstine kosti. Međutim, pokazano je da hidrostatički pritisak i hidrodinamički napon nastali usled proticanja intersticijalne tečnosti dovode do mehaničkih opterećenja koja utiču na ćelije kosti i mogu biti ključni faktori za stvaranje pravilno organizovanog i funkcionalnog tkiva kosti pre nego kompresioni naponi (*Freshney i sar., 2007*). Kada je kost izložena spoljašnjem mehaničkom opterećenju, intersticijalna tečnost protiče kroz mrežu kanalikula pri čemu hidrostatički pritisak gotovo trenutno dostiže maksimalnu vrednost od oko 270 kPa (*Zhang i sar., 1998*), ali i odmah opada usled oticanja tečnosti. Sa druge strane strujanje tečnosti izaziva tangencijalni napon koji deluje na membranu ćelija u opsegu od 0,006–3 Pa u zavisnosti od mehaničkog opterećenja (*Orr i Burg, 2008*).

#### 1.5.1.2 KOMPONENTE INŽENJERSTVA TKIVA

Osnovne komponente inženjerstva tkiva su ćelije, nosači i bioreaktori (slika 1.15).

Ćelije su prvi korak u procesu *in vitro* gajenja tkiva. Pri izboru tipa ćelija za inženjerstvo tkiva treba uzeti u obzir njihovu sposobnost proliferacije *in vitro*, fenotipsku stabilnost i imunogenost (*Sharma i Elisseeff, 2004*).



**Slika 1.15.** Osnovni koncept inženjerstva tkiva se sastoji od: izolacije ćelije iz donora (1), proliferacije izolovanih ćelija (2), sejanja ćelija na nosače (3), i od gajenja ćelija zasejanih na nosače (4). Nakon *in vitro* gajenja sledi implantacija dobijenog tkivnog ekvivalenta (5) (George, 2011)

Biomaterijali predstavljaju jednu od osnovnih komponenti tkivnog inženjerstva, kao i regenerativne medicine, gde mogu da budu korišćeni sami ili zajedno sa ćelijama. Najčešće korišćeni biomaterijali u inženjerstvu tkiva hrskavice i *nucleus pulposus* su prirodni i sintetski hidrogelovi. Od prirodnih najčešće su korišćeni agaroz, alginat, hitozan, kolagen, fibrin i hijaluronska kiselina, a od sintetičkih PVA, PEG, i poli(etilen oksid). Hidrogelovi u tkivnom inženjerstvu se mogu koristiti sami za popunjavanje defekata, sa imobilisanim bioaktivnim molekulima koji stimulišu reparaciju oštećenog tkiva, ili sa ćelijama kada predstavljaju nosače ćelija i njihova uloga je da ćelijama obezbede adekvatnu trodimenzionalnu strukturu kako bi regenerisale funkcionalno tkivo. Hidrofilna



sredina pogoduje velikom broju ćelija, tako da su hidrogelovi široko ispitivani za gajenje različitih tkiva. S obzirom na veliki udeo vode, hidrogelovi su po svojoj strukturi slični prirodnim mekim tkivima, što ih čini veoma atraktivnim nosačem ćelija u regeneraciji ovih tkiva. Najčešće korišćeni prirodni hidrogelovi u inženjerstvu tkiva hrskavice su alginat i agaroz, a od sintetskih to je *Pluronics* kopolimer poli(etilen oksida) i poli(propilen oksida). Jedna od prednosti hidrogelova je mogućnost njihove primene neinvazivnom metodom injektiranja što umanjuje rizik u odnosu na hirurške intervencije potrebne za implantaciju drugih tipova nosača (*Migliaresi i sar., 2007*). Nedostaci hidrogelova su generalno slaba mehanička čvrstoća, komplikovano procesiranje u određeni oblik, i sterilizacija.

Posebno se može izdvojiti primena alginatnih hidrogelova u inženjerstvu velikog broja tkiva, uključujući skeletne mišiće (*Kamelger i sar., 2004*), krvne sudove (*Lee i sar., 2003*), nerve (*Hashimoto i sar., 2005*), pankreas (*Korbitt i sar., 2004*), jetru (*Glicklis i sar., 2000*), i hrskavicu (*Fragonas i sar., 2000*). Tako na primer alginatni hidrogelovi podržavaju kulture hondrocita i sintezu vanćelijskog matriksa (*Sharma i Elisseeff, 2004*), a takođe mogu da podrže i diferencijaciju opredeljenih matičnih ćelija za mezenhimsko tkivo u pravcu hondrocita (*Weber i sar., 2002*). Uz to, ovaj prirodni hidrogel ima odlične bioinduktivne karakteristike, tako da imobilisani hondrociti u alginatnom matriksu zadržavaju svoj fenotip, vijabilnost i sintetišu komponente hrskavice (*van Susante i sar., 1995, Masuda i sar., 2003, Sharma i sar., 2004, Grunder i sar., 2004*). Isto tako ćelije kostne srži su u alginatu proliferisale i diferencirale u pravcu hondrocita (*Weber i sar., 2002*). U toku gajenja hondrocita imobilisanih u alginatu u periodu od osam meseci pokazano je da ćelije nisu izgubile svoje fenotipske karakteristike (*Hauselmann i sar., 1994*) i da je očuvana ekspresija tkivno specifičnih gena (*Chubinskaya i sar., 1998*).

PVA hidrogelovi su takođe veoma atraktivni za tkivno inženjerstvo različitih organa i tkiva kao što su srčani zalisci (*Jiang i sar., 2004*), hrskavica (*Stammen i sar., 2001, Bonakdar i sar., 2010*), rožnjača (*Fenglan i sar., 2007*) i *nucleus pulposus*

(Bader i Rochefort, 2008). PVA hidrogelovi su biokompatibilni, imaju visok modul elastičnosti čak i kada je procenat vode u gelu visok (Kobayashi i sar., 2005). Voda može da prodre u unutrašnjost ili da izađe iz mreže gela i tako obezbedi podmazivanje što za posledicu ima dobre biotriboške karakteristike PVA hidrogelova (trenje, habanje i podmazivanje) (Pan i sar., 2007). Za razliku od drugih hidrogelova, PVA hidrogelovi imaju malu sposobnost apsorpcije proteina što za posledicu ima slabu adhezivnost ćelija (Baker i sar., 2012).

PVA hidrogelovi zbog svoji mehaničkih karakteristika, kao i zbog visokog sadržaja vode su se pokazali kao veoma atraktivni za zamenu oštećene hrskavice. Mehaničke karakteristike hidrogela (dinamički modulus, zatezna čvrstoća) zavise od procenta polimera tako da se variranjem procenta polimera mogu dobiti hidrogelovi sa zateznom čvrstoćom od 1 do 17 MPa (Stammen i sar., 2001), što je u opsegu vrednosti za hrskavicu. Takođe dobijeni su dinamički moduli u opsegu od 0,0012-0,85 MPa (Baker i sar., 2012), a koeficijent trenja između 40 mas.% PVA hidrogela i hrskavice je 0,04-0,07, dok je između dve hrskavice <0,01-0,05 (Stammen i sar., 2001). Dobre karakteristike PVA hidrogelova dobijene u *in vitro* uslovima, podstakle su niz *in vivo* studija kako na životinjama tako i u kliničkim ispitivanjima u cilju zamene obolele ili oštećene hrskavice PVA hidrogelovima (Baker i sar., 2012). Tako je pokazano da kada su implantirani u pacijente na hondralne defekte kondila femura veličine oko 1,8 cm<sup>2</sup> i nakon 2 godine od implantacije hidrogel se zadržao na mestu implantacije, dok je koleno u potpunosti bilo funkcionalno.

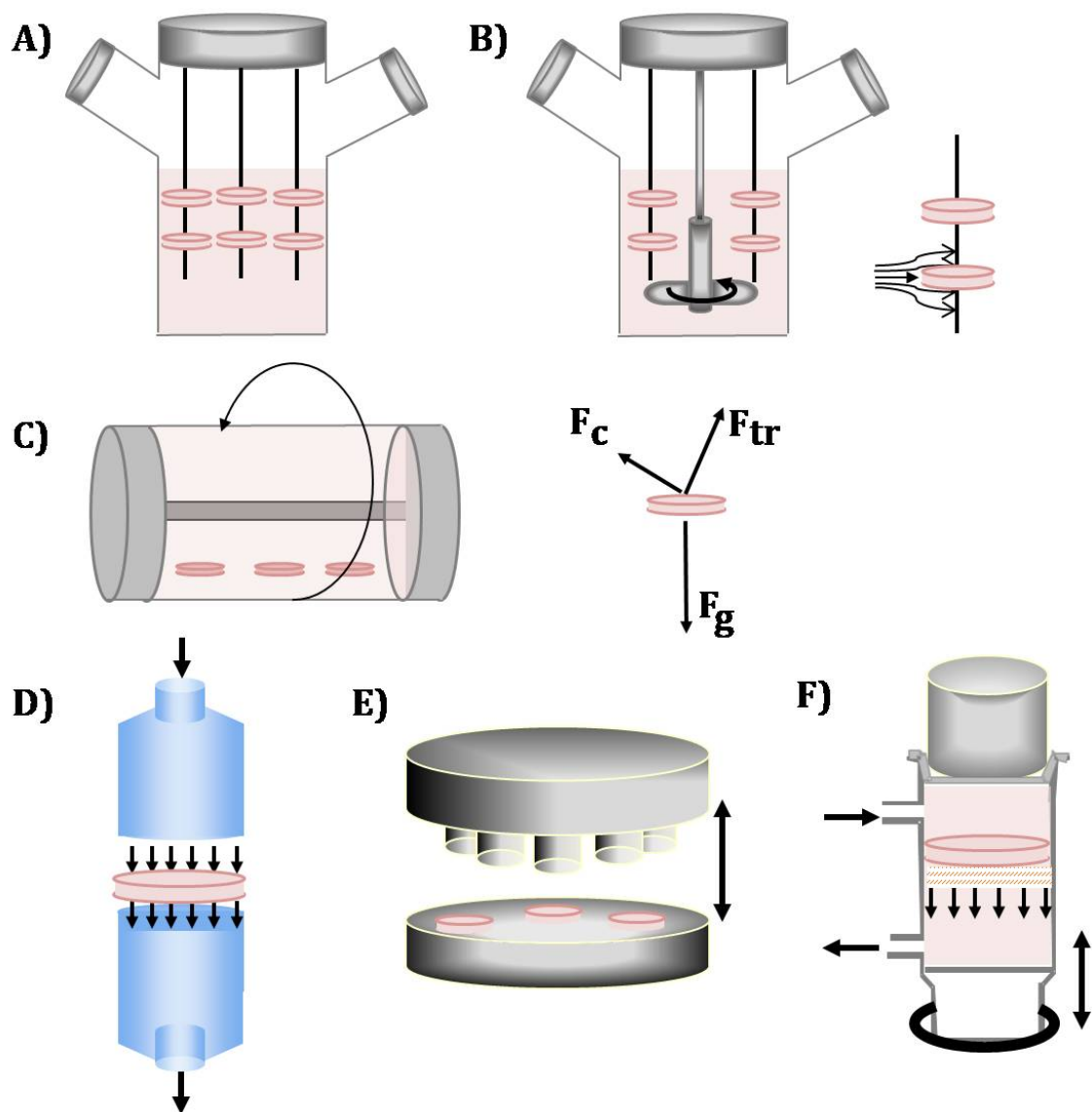
PVA hidrogelovi takođe imaju potencijalnu primenu u zameni *nucleus pulposus* zbog svojih specifičnih karakteristika koje su slične intervertebralnom disku (Bao i sar., 1996, Bao i Yun., 2000). Tako zahvaljujući visokom sadržaju vode i sposobnosti da bubre, hidrogelovi PVA u zavisnosti od opterećenja mogu da apsorbujue ili oslobode vodu, slično kao i prirodni *nucleus* (Bao i sar., 1996, Bao i Yun., 2000).

Za zamenu *nucleus pulposus*, kao i oštećene hrskavice, razvijeni su kopolimerni PVA/PVP hidrogelovi (Thomas i sar., 2004, Joshi i sar., 2006, Ma i sar.,

2009, Shi i Xiong, 2013). Pokazano je da PVA/PVP hidrogelovi dobijeni nakon 6 ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja imaju nepromenjene mehaničke karakteristike i nakon 10 miliona ciklusa dinamičkog opterećenja pri deformaciji od 15 % i frekvenciji od 5 Hz što odgovara fiziološkim uslovima u intervertebralnom disku (Joshi i sar., 2006). Takođe je pokazano, da kada se u kadaverični intervertebralni disk bez *nuclus pulposus* (čvrstoće 672 N/mm pri deformaciji od 15 %) implantira PVA/PVP hidrogel (čvrstoće 2,5 N/mm pri deformaciji od 15 %) dolazi do nelinearnog povećanja čvrstine (1351 N/mm pri deformaciji od 15 %) što ukazuje da dolazi do interakcije hidrogela i intaktnog *annulus fibrosus* (Joshi i sar., 2006).

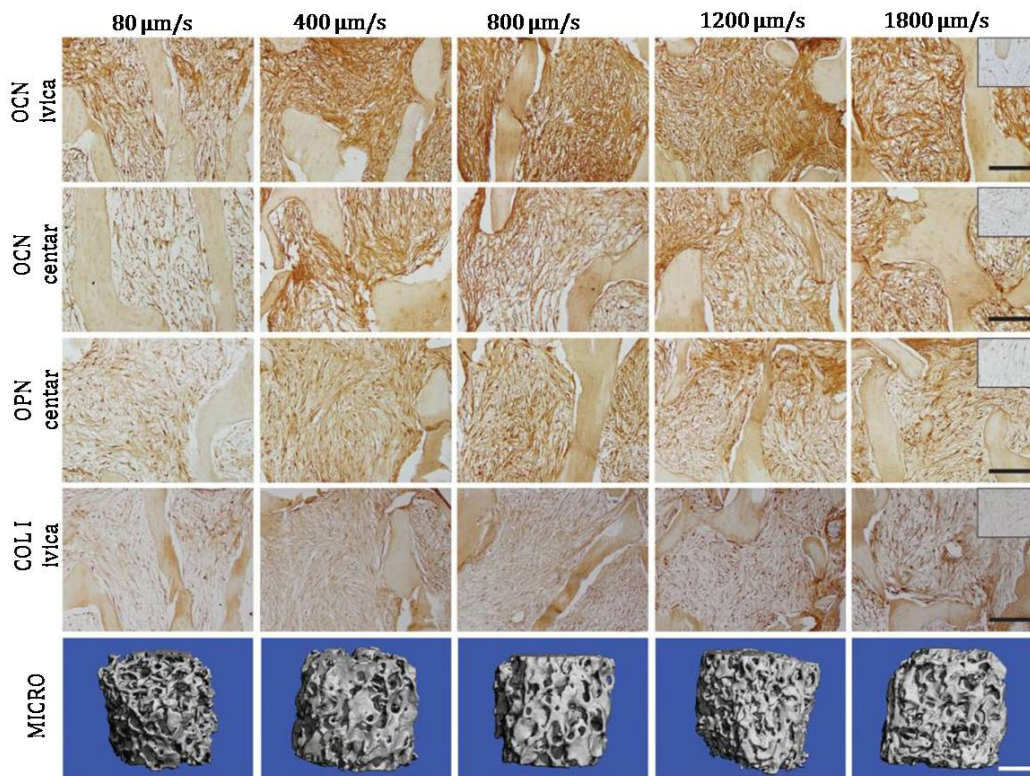
Bioreaktori predstavljaju sisteme koji imaju za cilj da omoguće stacionarne uslove u toku gajenja (npr. temperaturu, pH vrednost), efikasan prenos nutrijenata, gasova i regulatornih molekula, kao i optimalne fizičke signale (npr. adekvatni hidrodinamički uslovi, biomehanička stimulacija gajenog tkiva i mali smicajni napon na površini tkiva) (Freed i Vunjak-Novaković, 2000). Najčešće korišćeni bioreaktori su sudovi u kojima su tkivni ekvivalenti fiksirani i gaje se ili statički ili sa mešanjem (Vunjak-Novaković i sar., 1996), zatim rotacioni bioreaktori gde su tkivni ekvivalenti u stanju dinamičke ravnoteže pri laminarnom strujanju medijuma (Freed i Vunjak i sar., 1995), perfuzione komore gde medijum protiče ili oko tkiva (Mizuno i sar., 2001) ili kroz tkivo (Grayson i sar., 2008) i bioreaktori sa fizičkom stimulacijom.

Na slici 1.16 prikazani su pomenuti tipovi bioreaktora.



**Slika 1.16.** Različiti tipovi bioreaktora: A) sud bez mešanja; B) sud sa mešanjem i prikaz turbulentnog strujanja oko nosača sa ćelijama; C) rotacioni bioreaktor i prikaz nosača sa ćelijama u stanju dinamičke ravnoteže gde deluju: gravitaciona sila ( $F_g$ ), centrifugalna sila ( $F_c$ ) i sila trenja ( $F_{tr}$ ); D) perfuzioni bioreaktor; E) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom tkiva; F) bioreaktor sa perfuzijom i dinamičkom kompresijom

**Perfuzioni bioreaktor** omogućavaju direktnu perfuziju medijuma kroz gajeno tkivo i na taj način se povećava brzina prenosa mase nutrijenata i kiseonika unutar samog nosača ćelija, a izbegava se mehaničko mešanje medijuma. Podešavanjem protoka medijuma, tako da se dobiju intersticijalne brzine koje odgovaraju brzinama strujanja krvi u kapilarima (10 -100  $\mu\text{m/s}$ ), simulira se vaskularizacija tkiva (*Martin i sar., 2004*). Ovaj tip bioreaktora je veoma atraktivan za inženjerstvo tkiva koja zahtevaju efikasan dotok kiseonika, kao što su srčani mišić i tkivo kosti. Različiti eksperimenti su pokazali da kod bioreaktora sa direktnom perfuzijom je stimulisan rast, diferencijacija i mineralizacija matriksnog depoa koštanih ćelija (*Gail i sar., 2000*), zatim proliferacija humanih oralnih keratinocita, sinteza albumina u hepatocitima, ekspresija kardio-specifičnih markera u kardiomiocitima (*Radišić i sar., 2003*) i sinteza glikozaminoglikana u kulturama hondrocita (*Wu i sar., 1999, Osmokrović i sar., 2006*). Perfuzija medijuma se razmatra i kao fiziološki stimulus, jer simulira intersticijalni protok koji se dešava u kanalikulama tokom deformacije kosti koja je izazvana prirodnom kompresijom u toku normalnih dnevnih aktivnosti. Tako je ispitivanje uticaja različitih protoka medijuma (80–1800  $\mu\text{m/s}$ ) na diferencijaciju humanih mezenhimalnih ćelija gajenih na decelularizovanoj trabekularnoj kosti pokazalo da se najbolji osteogeni odgovori dobijaju pri površinskim brzinama medijuma u opsegu od 400-800  $\mu\text{m/s}$  (slika 1.17) (*Grayson i sar., 2011*).



**Slika 1.17.** Akumulacija proteina kosti i mineralizovanog matriksa. OCN - osteokalcin; OPN - osteoponin, COL I - kolagen I i MICRO - mineralizovani matriks (razmernik 1 mm) (Grayson i sar., 2011)

Nekoliko bioreaktora sa dinamičkom kompresijom je projektovano za inženjerstvo tkiva hrskavice, kao i kosti. Prvi bioreaktori sa dinamičkom kompresijom su dizajnirani kao statični sud u koji se smeštaju uzorci čija gornja površina može biti izložena mehaničkoj kompresiji pomoću klipa u fiziološkom opesegu deformacija i frekvencija (5-10 % i 0,1-1 Hz, redom) (Mauck i sar., 2000, 2002, Demarteau i sar., 2003a,b). Pokazano je da su teleći hondrociti, imobilisani u alginatne i agarozne gelove i izloženi periodničnom opterećenju (10 % deformacija, 1 Hz frekvencija, 1 h rad i 1 h pauza, 3 h dnevno tokom 5 nedelja), sintetisali i deponovali ekstracelularni matriks što je dovelo do poboljšanja biomehaničkih karakteristika tkivnog ekvivalenta u toku vremena (Mauck i sar., 2000, 2002). Takođe, kada su osteoblasti imobilisani unutar poliuretanskog nosača, a zatim gajeni 20 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (deformacija 5 %, frekvencija od 1 Hz, 2 h rad i 22 h pauza) došlo je do značajnog povećanja količine kolagena tipa I i kalcijuma u uzorcima koji su bili izloženi dinamičkoj

kompresiji, u odnosu na kontrolne uzorke (*Sittichockechaiwuta i sar., 2009*). U cilju poboljšanja prenosa mase konstruisan je novi protočni bioreaktor sa dinamičkom kompresijom (*Petrović i sar., 2009*). Ovaj reaktor pored toga što obezbeđuje da gajeno tkivo ili biomaterijal bude izloženo dinamičkoj kompresiji u fiziološkom opsegu (frekvencija 0,1-1 Hz, deformacija 5-10%), u isto vreme omogućava i konvektivni prenos mase unutar uzorka tkiva ili biomaterijala pomoću intersticijalnog kretanja fluida u fiziološkom opsegu brzina (10-100  $\mu\text{m/s}$ ) (slika 1.16F). Pokazano je da je nakon 2 nedelje gajenja telećih hondrocita imobilisanih u alginatne mikročestice u protočnom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (deformacija 10 %, frekvencija 0,42 Hz, 1 h rad i 1 h pauza) došlo do povećanja vrednosti modula elastičnosti pakovanog sloja alginatnih mikročestica najverovatnije usled značajnog povećanja ćelijske gustine, a detektovan je i početak stvaranja i akumulacije ECM (*Stojkowska i sar., 2010*).

## 1.5.2 OBLOGE ZA RANE

### 1.5.2.1 GRAĐA KOŽE

Koža je najveći organ humanog organizma i predstavlja omotač tela koji je u neposrednom dodiru sa spoljašnjom sredinom. Kožu čine tri osnovna sloja: epidermis, dermis i hipodermis (slika 1.18).

Epidermis kože koji je u najvećoj meri izložen spoljašnjim uticajima predstavlja višeslojni keratinizovan epitel, izgrađen od keratinocita. Broj slojeva epitela zavisi od toga da li se on posmatra u oblasti takozvane tanke (75-140  $\mu\text{m}$ ) ili debele kože (400-600  $\mu\text{m}$ ). Ova dva tipa kože se ne razlikuju samo po svojoj debljini nego i po postojanju dlaka to jest dlaka je prisutna samo u tankoj koži. U tankoj koži je epidermis izgrađen od četiri sloja, dok je u debeloj prisutno pet slojeva.

Najdublji sloj epidermisa koji leži na bazalnoj membrani naziva se *stratum basele* ili *stratum germinativum*. Iznad ovog sloja nalazi se *stratum spinosum*, nazvan još i *stratum Malpighi*, potom slede *stratum granulosum*, *stratum lucidum* i

na površini epiderma *stratum corneum*. U tankoj koži se ne zapaža *stratum lucidum*.

*Stratus basele* ili *stratum germinativum* se sastoji od jednog sloja ćelija koje naležu na bazalnu membranu. Ćelije ovog sloja imaju sposobnost mitotičke deobe tako da se u okviru ovog sloja obnavljaju ćelije gornjih regiona epidermisa.

*Stratum spinosum* obrazuje 3-5 slojeva keratinocita. Ove ćelije sintetisu niz omotavajućih proteina kao što su ilorikrin i involukrin.

*Stratum granulosum* obrazovan je od jednog sloja keratinocita pločastog oblika. Ove ćelije sintetisu proteine filagrin i lorikrin. Ovi proteini se sekretuju u međućelijski prostor gde dolazi do formiranja jedne vrste međućelijskog cementa koji predstavlja svojevrsnu barijeru koja umnogome sprečava prodiranje mikroorganizama u epidermis. S druge strane, ćelijska membrana je propustljiva za jone kalcijuma što dovodi do aktivacije enzima koji omogućavaju poprečno povezivanje lirikrina, involukrina i drugih omotavajućih proteina koji obrazuju sloj debljine 15–20 nm.

*Stratum lucidum* čini jedan sloj keratinocita pločastog oblika koji su međusobno povezani i postoji samo kod histološki debele kože.

*Stratum corneum* čini nekoliko slojeva mrtvih, keratinizovanih ćelija koje se postepeno odstranjuju perutanjem. Stoga se često se nazivaju i rožnim ćelijama.

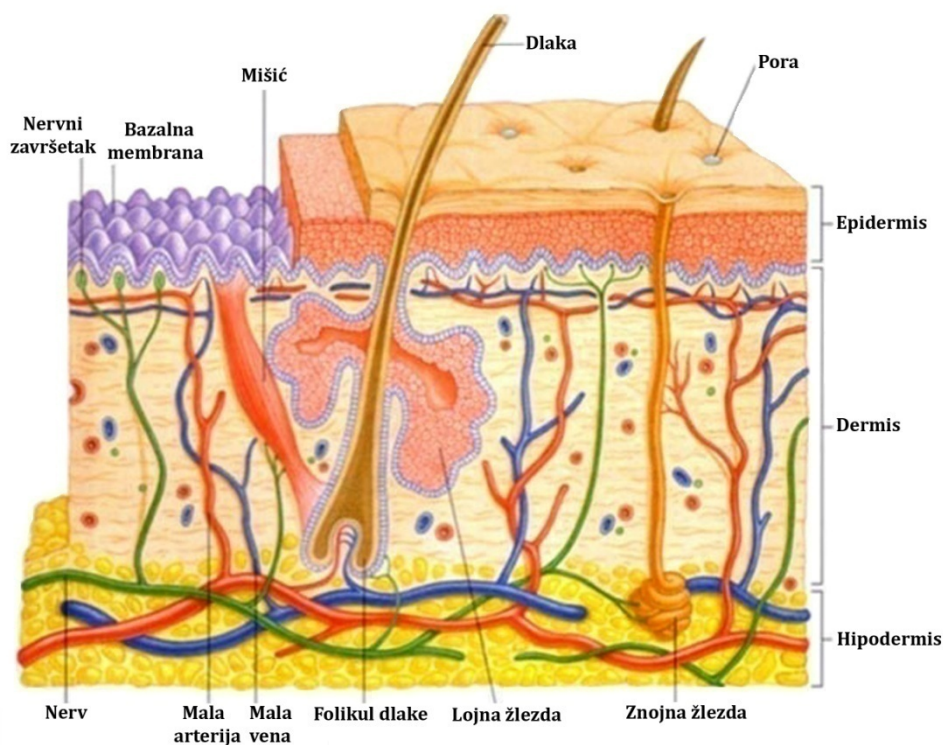
Pored keratinocita u izgradnji epidermisa učestvuju i melanociti, Langerhansove i Merkelove ćelije. Melanociti u svojim granulama poseduju melanin i karoten što omogućava zaštitu od ultravioletnih zraka, kao i obojenost kože. Langerhansove ćelije pripadaju grupi ćelija koje učestvuju u imunskom odgovoru, dok se Merkelove ćelije smatraju čulnim ćelijama, ali i endokrinim žlezdanim ćelijama koje iz vanćelijske sredine uzimaju amine i njihove prethodnike i obavljaju dekarboksilaciju amino kiselina (Šerban, 1995).



Dermis ili krzno predstavlja najdeblji sloj kože (1-2 mm) izgrađen od vezivnog tkiva, koji obezbeđuje čvrstinu i mehaničku potporu. Dermis se nalazi neposredno ispod epidermisa i granica između ova dva sloja je bazalna membrana. U ovom sloju se nalaze krvni i limfni sudovi, nervni završeci, kožne žlezde, mišićne i pigmentne ćelije, kao i koren dlake. Unutar dermisa razlikuju se dva sloja: površinski sloj (*stratum papillare*) i mrežasti sloj (*stratum reticulare*). *Stratum papillare* se sastoji od rastresitog neorganizovanog vezivnog tkiva sa mnogo elastičnih i retikulinskih vlakana, kapilara i nervnih završetaka. U ovom sloju su prisutni fibroblasti, makrofagi, adipociti, kao i limfociti. *Stratum reticulare* je sastavljen od gustog vezivnog tkiva bogatog kolagenim vlaknima, dok su od ćelija najzastupljeniji fibroblasti. Kolagena i elastinska vlakna se horizontalno prepliću ka površini kože. U ovom sloju derma su smeštene lojne i znojne žlezde, folikuli dlaka, kao i mišići. Ovaj sloj kože je takođe vrlo dobro vaskularizovan i inervisan.

Hipodermis ili potkožno tkivo je najdublji sloj kože obrazovan od rastresitog vezivnog tkiva u kome je prisutna različita količina masnog tkiva koje ima termoenergetsku ulogu jer predstavlja rezervni oblik energije, kao i toplotni izolator. U ovom sloju su takođe prisutni krvni i limfni sudovi, nervi i inkapsulirana čulna telašca.

Koža ima višestruku ulogu: i) zaštita unutrašnjosti od svih spoljašnjih uticaja, ii) održavanje stalne telesne temperature, iii) odavanje viška toplote putem znojenja, iv) ekskrecija preko znojnih i lojnih žlezda, v) sinteza vitamina D pod dejstvom UV zračenja, i vi) čulna uloga.



**Slika 1.18.** Građa kože: višeslojni epidermis odvojen od dermisa bazalnom membranom i hipodermis najdublji sloj kože

#### 1.5.2.2 TIPOVI RANA

Rana (*vulnus*) je povredom izazvan prekid anatomskog i funkcionalnog kontinuiteta tkiva, koji zahvata kožu ili sluzokožu i može prodreti u dublje slojeve tkiva u različitom stepenu (Šitum i Kolić, 2012). Rane nastaju usled povrede koje mogu biti mehaničke (ubod, udarac, cepanje, vatreno oružje, humani ili animalni ujed), fizičke (opekotine, promrzline) ili hemijske (hemijske opekotine) povrede.

Jedna od najčešćih povreda su opekotine. Opekotina (*combustio*) je vrsta hipertermičke povrede koja može nastati dejstvom električne struje, hemikalija, suve toplote, vrele tečnosti i gasa, zračenja ili trenja. Na osnovu dubine oštećenja kože opekotine se mogu podeliti na: i) opekotine I stepena, odnosno površinske opekotine koje zahvataju samo epidermis, ii) opekotine IIa stepena, zahvataju epidermis i površinske slojeve dermisa (*stratum papillare*), iii) opekotine IIb stepena, zahvataju epidermis i dublje slojeve dermisa (*stratum reticulare*), iv)

opekotine III stepena, zahvataju epidermis, dermis i hipodermis, i v) opekotine IV stepena, zahvataju sve slojeve kože kao i mišiće i kost (*Granger i sar., 2009*).

Prema dubini, rane se mogu podeliti na: i) površinske ako je oštećen samo epidermis, ii) delimično duboke (oštećen je epidermis i dublji slojevi dermisa), i iii) duboke (oštećen je i hipodermis). Takođe, rane se prema kliničkoj slici i dužini trajanja mogu podeliti na akutne i hronične (*Rajkov i sar., 2007*).

Akutne rane su rane uzrokovane traumom ili hirurškim zahvatom za čije je zarastanje u proseku potrebno oko tri nedelje. Na sporo zarastanje akutnih rana i njihov prelazak u hronični oblik mogu uticati sistemski i lokalni faktori. Sistemski faktori su: slaba pokretljivost, sistemski maligniteti, hemio- i radio-terapija, hronične bolesti kao što su dijabetes, srčana insuficijencija i hronična bubrežna insuficijencija. Lokalni faktori su: neadekvatna vaskularizacija, edem, prisustvo eksudata i infekcije u rani.

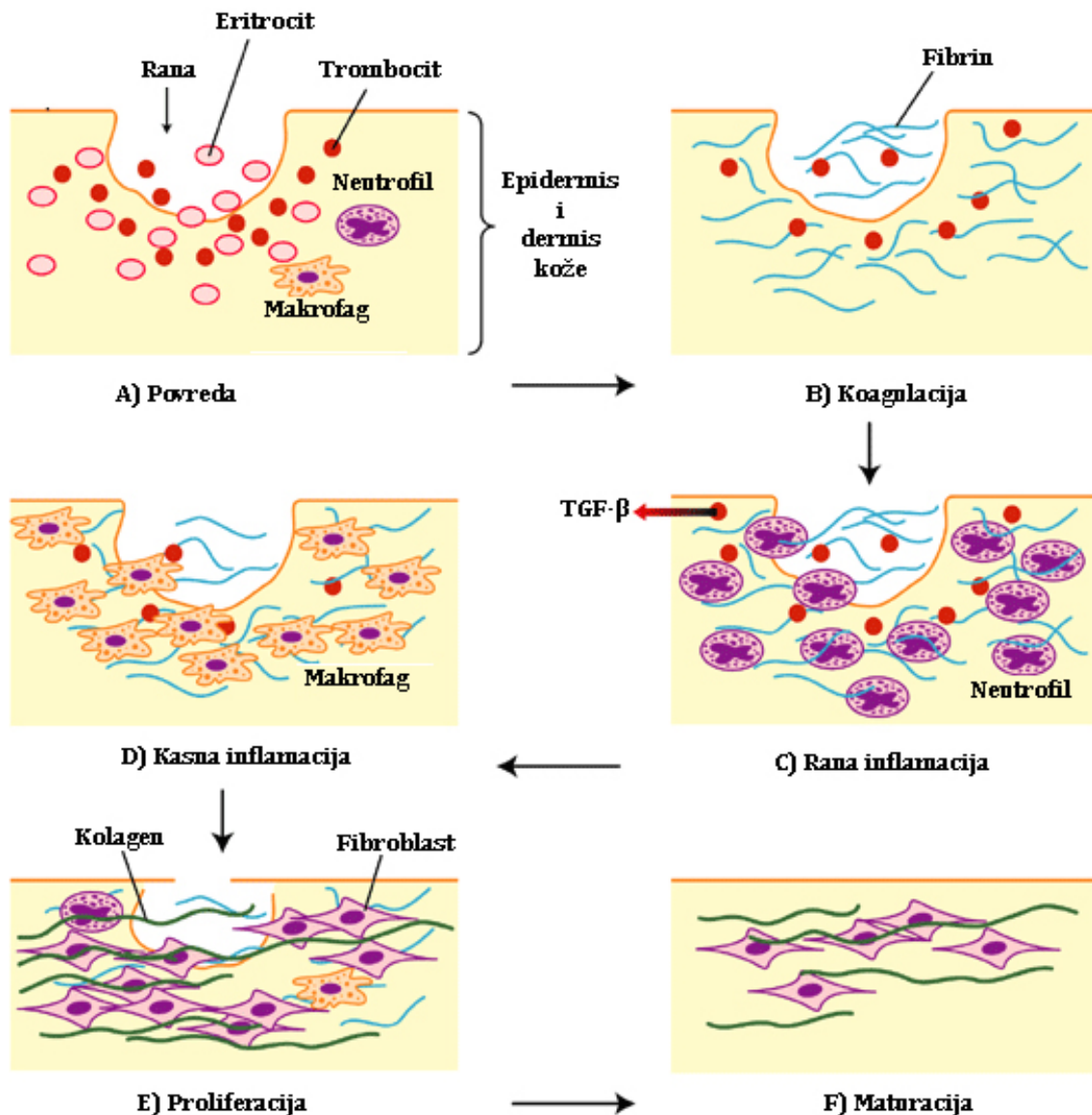
Hronične rane su rane koje nastaju kao posledica neadekvatnog lečenja akutne rane ili kao posledica destrukcije tkiva usled patoloških poremećaja u organizmu (šećerna bolest, bolesti arterija, vena itd). Hronične rane se karakterišu produženim vremenom zarastanja, što je značajno više od prosečnog vremena za reepitelizaciju povrede zdravog tkiva. Vreme zarastanja rane od 6-8 nedelja do više meseci, pa i godina tipična je odrednica u definiciji hroničnih rana (*Dale i sar., 1983*). Za hronične rane je karakteristična hronična inflamacija tkiva, smanjena sinteza vanćelijskog matriksa, veći nedostatak tkiva, devitalizacija tkiva, mešovita infekcija uz formiranje biofilma. Najčešće hronične rane su venski ulkusi (čirevi), dekubitalni ulkusi, arterijski ulkusi i onkološke rane.

### 1.5.2.3 PROCES ZARASTANJA RANA

Proces zarastanja rane se može podeliti u 4 faze: i) hemostaza ili vaskularni odgovor, ii) inflamacija ili zapaljenje, iii) proliferacija, i iv) maturacija ili remodelovanje (slika 1.19) (*Matamal, 1998*).

Hemostaza (zaustavljanje krvarenja) je prva faza zarastanja rane u kojoj usled krvarenja dolazi do ispiranja rane, a zatim do vazokonstrikcije krvnih sudova (nakon 5-10 minuta od povrede), kao i do agregacije trombocita usled čega se stvara trombocitni čep i zaustavlja se krvarenje (*Verstreeg i sar., 2013*). Nakon prestanka krvarenja dolazi do vazodilatacije krvnih sudova, pri čemu se smanjuje protok krvi, a zidovi krvnih sudova postaju propustljivi za leukocite. Tako da se već nakon 45 min od povrede može uočiti prisustvo leukocita u oštećenom tkivu.

Sledeća faza je faza inflamacije koja se može podeliti na rano i kasno zapaljenje rane. Rano zapaljenje rane, nastaje nakon 24-48 h od povrede kada granulociti, među kojima su dominantni neutrofil, migriraju iz krvi u oštećeno tkivo, proliferišu i uklanjaju mikroorganizme, kao i strane sadržaje iz rane. Kasno zapaljenje rane, nastaje nakon 48-72 h od povrede kada monociti iz krvi prelaze u oštećeno tkivo i transformišu se u makrofage koji fagocitiraju nekrotično tkivo i mikroorganizme.



**Slika 1.19.** Proces spontanog ozdravljenja rane. A i B) Hemostaza-odmah nakon povrede: trombociti zaustavljaju krvarenje i uočava se prisustvo neutrofila i makrofaga. C) Faza rane inflamacije kada su u oštećenom tkivu dominantni neutrofil. D) Faza kasne inflamacije kada su u oštećenom tkivu dominantni makrofagi. E) Faza proliferacije u kojoj fibroblasti sintetišu komponente vanćelijskog matriksa. F) Faza maturacije ili remodelovanja u kojoj se odvija reorganizacija vanćelijskog matriksa (*Beanes i sar., 2003*)

Proliferativna faza nastaje između 5-og i 7-og dana i traje do 2-3 nedelje od nastanka povrede. Ova faza počinje deponovanjem fibrina i fibrinogena koji formiraju matriks koga naseljavaju trombociti i makrofagi (*Lorenz i Longaker, 2003*). Makrofagi oslobađaju faktore rasta koji aktiviraju fibroblaste i oni migriraju u ranu koristeći matriks od fibrina i fibrinogena. Fibroblasti proliferišu, a zatim počinju da sintetišu i sekretuju vanćelijski matriks. Početno sintetisani matriks se sastoji od fibrina, glikozaminoglikana (GAG) i hijaluronske kiseline (*Lorenz i Longaker, 2003*). Zbog velikog sadržaja vode ovaj matriks poboljšava migraciju ćelija. Kada fibroblasti uđu i nasele ranu, uz pomoć enzima hijaluronidaze dolazi do digestije matriksa bogatog hijaluronskom kiselinom i deponuje se sulfatisani glikozaminoglikan (sGAG). Istovremeno, u matriks od fibronektina i GAG fibroblasti deponuju kolagen, koji je ključni element u fazi zarastanja rane jer daje čvrstoću i integritet tkivu. Pri tome deponovani kolagen nije pravilno organizovan. U ovoj fazi dolazi i do angiogeneze, stvaranja novih krvnih sudova. Kao proizvod proliferacije fibroblasta, sinteze kolagena i angiogeneze nastaje granulaciono tkivo. U njemu se nalazi veliki broj makrofaga koji sprečavaju nastanak infekcije. Granulaciono tkivo popunjava defekt i obezbeđuje podlogu za epitelizaciju koja kreće od ruba rane tako da se u ovoj fazi uočava novostvoreno epitelno tkivo koje prijanja čvrsto za granulaciono tkivo. Takođe, u granulaciono tkivu se nalaze i miofibroblasti koji imaju zadatak da izvrše kontrakciju rane tako da u ovoj fazi dolazi do skupljanja krajeva rane.

Poslednja faza procesa zarastanja rane je maturacija oštećenog tkiva koja traje od 21-og dana do 1 godine od momenta povrede. U ovoj fazi dolazi do strukturnih i funkcionalnih promena vanćelijskog matriksa, odnosno dolazi do preuređivanja i umrežavanja kolagenih vlakana, kao i do zamene kolagena tipa II kolagenom tipa I (*Lorenz i Longaker, 2003*).

Ukoliko zarastanje rane zastane u nekoj od gore navedenih faza, rana prelazi u hronični oblik čiji proces zarastanja traje izuzetno dugo.

Jedan od veoma značajnih faktora prilikom zarastanja je pH vrednost rane (*Gethin, 2007*). pH vrednost rane utiče na oslobađanje kiseonika, angiogenezu,

proteaznu aktivnost i rast bakterija. Poznato je da rane bilo da su akutne ili hronične sporije zarastaju ako im je pH vrednost povišena (alkalna) nego kada je blizu neutralne (Gethin, 2006). pH vrednost hronične rane koja ne zarasta se kreće od 7,15 do 8,9 (Gethin, 2008). Pokazano je da kada je pH vrednost hronične rane koja nije zarastala snižena za 0,1 pH jedinicu došlo je do smanjenja veličine rane za 8,1 % (Gethin, 2008). Kiselost rane ubrzava njeno zarastanje jer se povećava procenat kiseonika, njegovim oslobađanjem iz hemoglobina iz kapilara (Rendel i sar., 2001) i inhibira se aktivnost proteinaze, koja usporava ili sprečava zarastanje rana jer uništava faktore rasta, proteinska vlakana i fibronektin u matriksu rane koji je pak neophodan za aktivaciju fibroblasta i njihovu migraciju (Rushton, 2007).

#### 1.5.2.4 TRETMAN RANA

Prvi korak u tretmanu rana je njihovo čišćenje. Postoji veliki broj klasičnih preparata za toaletu rane kao što su fiziološki rastvor, povidon pena, borna kiselina, kalijum permanganat i mnogi drugi. Nakon čišćenja rane sledi njeno previjanje adekvatnom oblogom. Obloge za rane treba da: i) zaštite ranu od fizičke povrede, ii) apsorbuju eksudate rane kako bi se sprečila maceracija kože oko rane, iii) obezbede adekvatnu vlažnost, temperaturu i pH rane što stimuliše reepitelizaciju i migraciju ćelija neophodnih za ozdravljenje rane, iv) omoguće razmenu gasova, to jest ulazak kiseonika i izlazak ugljen dioksida, v) zaštite ranu od kontaminacije, i vi) potpomognu debridman rane (Hanna i Giacobelli, 1997, Boateng i sar., 2008).

Opšta podela obloga za rane je na primarne i sekundarne (Hanna i Giacobelli, 1997). Primarne obloge su one koje su u direktnom kontaktu sa površinom rane, a sekundarne obloge imaju ulogu držanja primarne obloge na pravom mestu, a istovremeno štite površinu rane od uticaja spoljne sredine (Hanna i Giacobelli, 1997). Takođe obloge za rane se mogu podeliti prema: i) formi (filmovi, gelovi, pene i masti), ii) funkciji (antimikrobne, adhezivne, apsorptivne, itd.), iv) materijalu od koga su napravljene (alginatne, hidrokolooidne, poliuretanske itd.), kao i na v) tradicionalne i savremene (Boateng i sar., 2008).

U tradicionalne obloge za rane spadaju pamučna vata, prirodne i sintetičke gaze i zavoji. Ove obloge su suve i ne obezbeđuju adekvatnu vlažnost rane. Zavoji od poliamida i celuloze se koriste kao sekundarne obloge kako bi se primarna obloga fiksirala za ranu, dok se visoko kompresovani zavoji koriste za tretman venske insuficijencije, a slabo rastegljivi kompresivni zavoji za venske ulcere na nogama i limfoedeme (*Boateng i sar., 2008*). Sterilna gaza se koristi za apsorpciju eksudata rane i treba je menjati često kako bi se izbegla maceracija zdravog tkiva (*Boateng i sar., 2008*). Ova obloga štiti ranu od bakterija, ali to svojstvo gubi kada obloga postane vlažna zbog eksudata rane ili usled spoljašnjeg kvašenja. Takođe, gaza prijanja za ranu i njeno uklanjanje izaziva traumu (*Calo i Khutoryanskiy, 2015*). Gaza obezbeđuje slabu zaštitu rane od spoljašnjih povreda i prljavštine. Takođe gaza dozvoljava evaporaciju vlage što se ogleda u dehidraciji kreveta rane. Treba naglasiti da se tradicionalne obloge mogu koristiti za čiste (neinficirane) rane, zatim za tretman suvih rana ili kao sekundarne obloge da apsorbuju eksudat rane (*Boateng i sar., 2008*).

Savremene obloge su razvijene u cilju zadržavanja vlažnosti rane kako bi se ubrzalo njeno ozdravljenje. Vinter (*Winter*) je još 1962. godine ukazao da vlažnost rane stimuliše proces ozdravljenja, ali je tek nedavno ovaj nalaz ozbiljno shvaćen (*Calo i Khutoryanskiy, 2015*). Savremene obloge se mogu podeliti na hidrokolojne obloge i hidrogelove (*Calo i Khutoryanskiy., 2015*).

**Hidrokolojne obloge** su opisane kao obloge koje se sastoje od materijala koji imaju sposobnost da formiraju gel (npr. karboksimetilceluloza, pektin i želatin) (*Ousey i sar, 2012*). Ove obloge mogu biti u formi filma, ploča, paste ili praška. Intaktna hidrokolojna obloga je nepropustljiva za isparavanje vode, ali ima sposobnost da upija eksudat rane, i kada stupi u kontakt sa eksudatom dolazi do formiranja pokrivača rane od hidrofilnog gela, koji je propustljiv za vodu i vazduh (*Thomas i Loveless, 1997*). Glavne karakteristike hidrokolojnih obloga su: i) štite ranu od prodora mikroorganizama i tako smanjuju rizik od infekcije, ii) snižavaju pH rane što redukuje sposobnost bakterija da se umnožavaju, iii) održavaju vlažnost kreveta rane što ubrzava reepitelizaciju i smanjuje bol,



iv) štite ranu od isušivanja, i v) ne izazivaju traumu prilikom uklanjanja (Queen, 2009). Takođe, hidrokoloidne obloge stimulišu formiranje granulacionog tkiva, promovišu angiogenezu, povećavaju broj fibroblasta u dermu i povećavaju procenat novosintetisanog kolagena (Ousey i sar., 2012). Kada se formira gel, obloga rehidrira suvo, sasušeno nekrotično tkivo i tako stimuliše autolitički debridman rane (Fletcher, 2005). Hidrokoloidne obloge se primenjuju kod venske i arterijske ulceracije, dijabetične ulceracije, dekubitalne rane, traumatske i postoperativne rane, kao i kod opekotina.

**Hidrogelovi** su kao što je već opisano, nerastvorni, hidrofilni gelovi koji imaju sposobnost da bubre. Obloga u formi hidrogela pomaže autolitički debridman, povećava sintezu kolagena i vlažnost nekrotične rane i apsorbuje i zadržava kontaminirani eksudat unutar gela (Calo i Khutoryanskiy, 2015). Pokazano je da hidrogelovi imaju važnu ulogu u tretmanu opekotina jer hlade i hidriraju ranu, kao i u tretmanu dubokih rana jer mogu da popune šupljinu rane (Calo i Khutoryanskiy, 2015).

Tokom poslednje decenije su se pokazali kao pogodni materijali za obloge za rane PVP (Rosiak i sar., 1993 i 1995, Benamer i sar., 2006), PVA (Varshney, 2007), poli(etilen oksid) (Tranquilan-Aranilla i sar., 1999) i polisaharidi kao što su alginat, hitozan, kolagen i celuloza (Liu i Berg, 2002, Knill i sar., 2004).

Obloge na bazi kalcijum alginata uspešno regulišu nivo vlage u ranama , što dovodi do brže granulacije i reepitelizacije oštećenog tkiva (Paul i Sharma, 2004, Queen i sar., 2004). Ca-alginatne obloge imaju značajnu ulogu u početnoj fazi ozdravljenja rane (hemostaza) jer oslobađanje jona kalcijuma iz obloge omogućava pretvaranje protrombina u trombin što dovodi do bržeg zaustavljanja krvarenja (Riddel i sar., 2007, Boateng i sar., 2008). Pokazano je da neke alginatne obloge aktiviraju makrofage koji su neophodni u fazi inflamacije i na taj način stimulišu proces ozdravljenja rane (Thomas i sar., 2000). Takođe, je pokazano da Ca-alginatne obloge stimulišu proliferaciju fibroblasta koji su neophodni u formiranju vanćelijskog matriksa (Doyle i sar., 1996). Prednost primene alginatnih obloga je i njihovo lako uklanjanje i zamena bez izazivanja mnogo traume, usled

hidrofilne prirode gela (Paul i Sharma, 2004). Međutim, ove obloge nisu najefikasnije u tretmanu inficiranih rana jer nemaju antimikrobna svojstva. U cilju poboljšanja karakteristika alginatnih obloga razvijene su alginatne obloge sa jonskim srebrom koje imaju antimikrobno dejstvo (Qin, 2005, Jude i sar., 2007). Kao što je već rečeno, joni srebra ispoljavaju antimikrobnu aktivnost prema različitim mikroorganizmima (Slawson i sar. 1992, Bhattacharya i Mukherjee, 2008, Armentano i sar., 2010). Takođe, poznato je da su nanočestice potentnije od jonskog srebra, pa su razvijene i alginatne obloge sa nanočesticama srebra (Seo i sar., 2012).

PVP hidrogelovi su mekani i elastični, i apsorbuju veliki procenat tečnosti kao što je već rečeno, ali predstavljaju i dobru barijeru za mikroorganizme, što ih čini veoma atraktivnim za tretman rana (Benamer i sar., 2006, Gibas i Janik, 2011). Tako je pokazano da PVP hidrogelovi dobijeni radijaciono-hemijskim putem podvrgnuti testu penetracije mikroorganizama (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas maltophilia*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia plymuthica*, *Staphylococcus epidermidis*) ni nakon 14 h inkubacije na 30 °C ne dozvoljavaju prodor mikroorganizama u gel (Benamer i sar., 2006). U cilju poboljšanja mehaničkih karakteristika, PVP se često kombinuje sa drugim polimerima kao što je PVA (Razzak i sar., 2001, Park i Nho, 2003), celuloza (Roy i sar., 2012), i PEG (Lugao i sar., 2002, Barmplexis i sar., 2013) pri čemu se ne narušavaju navedene karakteristike neophodne za primenu hidrogela u tretmanu rana (Razzak i sar., 1999, Park i Nho, 2003). Takođe, veoma atraktivni za tretman inficiranih rana su PVP hidrogelovi sa inkorporisanim nanočesticama srebra (Jin i sar., 2005, Yu i sar., 2007, Jovanović i sar., 2013).

Tokom poslednjih nekoliko decenija mnoge istraživačke grupe su ispitivale uticaj meda na ozdravljene različitih rana (Moore i sar., 2001, Visavadia i sar., 2008). Med je viskozni, saturisani šećerni rastvor koji su još Egipćani i stari Grci koristili u tretmanu rana. Pokazano je da topikalna primena meda: i) brzo uklanja infekciju, ii) ubrzava debridman, iii) minimizuje ožiljak, iv) brzo neutrališe neprijatan miris kreveta rane, v) skraćuje period ozdravljenja rane, i vi) ima

umirujući efekat na rane naročito na opekotine (Molan, 2002). Antimikrobna aktivnost meda zasniva se na visokom osmolaritetu, niskoj pH vrednosti, kao i na produkciji vodonik peroksida (French i sar., 2005). Osmotski pritisak izvlači tečnost iz bakterija što sprečava njihov rast. Enzim glukozna oksidaza je u medu neaktivan, a aktivira se razblaživanjem meda u kontaktu sa eksudatom iz rane što pokreće reakciju između glukoze i vode u kojoj se oslobađa vodonik peroksid u malim koncentracijama, koji inhibira rast bakterija. U *in vitro* uslovima je pokazano da med deluje antiinflamatorno, kao i da stimuliše proliferaciju, maturaciju, ćelijsko-ćelijsku interakciju keratinocita, što ubrzava ozdravljenja rane (Du Toit i Page, 2009, Barui i sar., 2013). Pokazano je da proteini koji se nalaze u mede imaju imunomodulatorno dejstvo na keratinocite, makrofage i neutrofile (Majtan i sar., 2014). Takođe, niska pH vrednost meda, 3,2 - 5,5 u zavisnosti od vrste meda (Molan, 1992, Aureli i sar., 2002), snižava pH vrednost rane i ona postaje kisela što ubrzava zarastanje (Rendel i sar., 2001, Molan, 2002, Gupta i sar., 2011), i stimuliše granulaciju tkiva (Rushton, 2007).

## 1.6 KARAKTERISANJE NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA ZA BIOMEDICINSKU PRIMENU

Razvoj novih biomaterijala za biomedicinsku primenu zahteva različita ispitivanja i karakterisanja biomaterijala kako sa stanovišta hemijskog sastava i fizičkih svojstava tako i sa stanovišta biokompatibilnosti i funkcionalnosti. Pri primeni nanomaterijala je još od posebnog značaja ispitivanje citotoksičnosti i interakcija nanočestica i ćelija i tkiva. Uz to, da bi se razvio optimizovan biomaterijal potrebno je rezultate svih ispitivanja povezati i objasniti radi mogućnosti pouzdanog predviđanja ponašanja i funkcije biomaterijala u željenoj primeni. Sa tog stanovišta razvoj novih nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra za potencijalnu biomedicinsku primenu zahteva različita ispitivanja u *in vitro* uslovima, kao što su ispitivanje citotoksičnosti, biomehaničkih karakteristika, antimikrobne aktivnosti i kinetike otpuštanja srebra, a zatim i ispitivanje funkcionalnosti u *in vivo* uslovima.

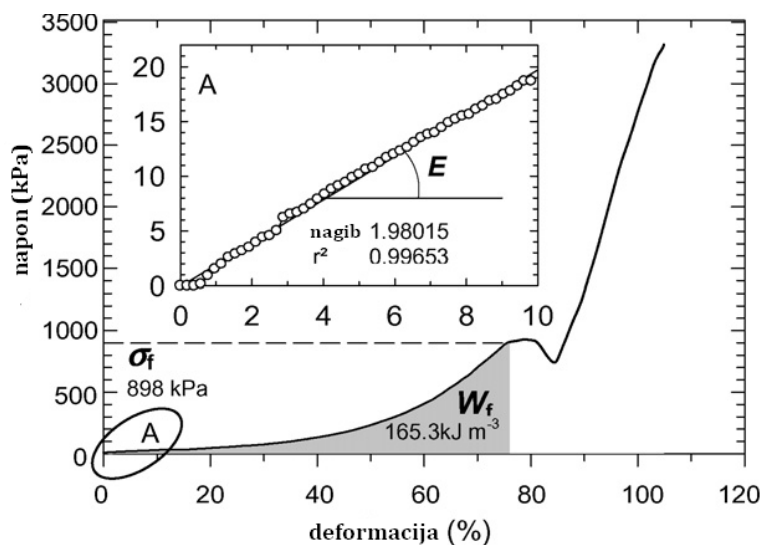
Da bi se uopšte razmatrala mogućnost biomedicinske primene nekog materijala potrebno je da taj material nije citotoksičan. Citotoksičnost označava izazivanje toksikacije na ćelijskom nivou. Toksičan material je definisan kao materijal koji ispušta dovoljnu količinu supstance koja inhibicijom ključnih metaboličkih puteva na direktan ili indirektan način dovodi do ćelijske smrti (Đorđević, 2010). Citotoksičnost u *in vitro* uslovima se tradicionalno ispituje u dvodimenzionalnim (2D) ćelijskim kulturama. Ćelije koje se najčešće koriste za ispitivanje citotoksičnosti biomaterijala su fibroblasti, jer su to jedne od prvih ćelija koje naseljavaju ranu u toku njenog zarastanja, a često su i jedine ćelije koje se vezuju za implante u okolnim tkivu. Za ispitivanje citotoksičnosti biomaterijala u *in vitro* uslovima koriste se sledeći testovi u 2D ćelijskim kulturama: i) test direktnog kontakta, ii) test agar difuzije, i iii) test elucije ili ekstraktne dilucije (Đorđević, 2010). Test direktnog kontakta omogućava direktan kontakt ćelija u monosloju i ispitivanog biomaterijala. Kod agar difuzionog testa monosloj ćelija se prekriva rastvorom agra (2 mas.%), na koji se pošto agar očvrstne stavlja ispitivani biomaterijal. Test elucije se bazira na ekstrakciji ispitivanog biomaterijala u određenom rastvoru (npr. fiziološki rastvor ili medijum za gajenje), nakon čega se ekstrakt dodaje ćelijama u monosloju.

*In vitro* testovi citotoksičnosti u 2D ćelijskim kulturama omogućavaju brzo dobijanje podataka o citotoksičnosti biomaterijala, ali se postavlja pitanje da li dobijeni rezultati pouzdano predviđaju pojave koje će nastati u mnogo složenijim *in vivo* uslovima. Dobro je poznato da 2D ćelijska kultura ima nekoliko ograničenja u odnosu na *in vivo* sredinu kao što su gubitak trodimenzionalne strukture tkiva, izostanak interakcije ćelija sa ekstracelularnim matriksom i između samih ćelija, kao i gubitak biofizičkih i biohemijskih signala (Mazzoleni i sar., 2009). Primenom biomimičnih bioreaktorskih sistema prevazišli bi se problemi klasičnih *in vitro* testova. Pokazano je da biomimični bioreaktorski sistemi predstavljaju pogodno instrumente za fiziološki relevantnu evaluaciju biomaterijala i studije interakcija ćelija i biomaterijala što bi moglo da smanji obim neophodnih testova na životinjama (Engelmayr Jr i sar., 2003, Stojkowska i sar., 2010, Mobasheri i Lewis, 2013, Wang i sar., 2013).

Kao sledeća faza karakterizacije, posebno kada je reč o biomaterijalima koji će se koristiti kao implantati, može se izdvojiti biomehanička karakterizacija pošto su sva tkiva i organi u organizmu izloženi određenim mehaničkim naprezanjima i fizičkim signalima.

Hidrogelovi su viskoelastični materijal (*Doublier i sar., 1992, Junter i Vinet, 2009*). Kao što je već rečeno viskoelastično ponašanje podrazumeva da se materijali pod dejstvom spoljašnje sile ponašaju na način koji se nalazi između ponašanja elastičnih čvrstih tela i tečnosti (*Jovanović i Jeremić, 2007*). Osnovna svojstva koja karakterišu mehaničko ponašanje viskoelastičnih materijala su: i) promena dimenzije sa vremenom pri većem ili konstantnom opterećenju (tzv. puzanje), ii) smanjenje sila kojima se materijal opire deformaciji stalne veličine, odnosno pod dejstvom opterećenja materijal se deformiše i prelazi u neko neravnotežno stanje iz koga spontano teži da pređe u novo ravnotežno stanje (relaksacija materijala), i iii) javljanje zaostale deformacije pri cikličnom istezanju ili kompresiji materijala (histerezis) (*Plavšić, 2010*).

Na slici 1.20 je prikazana kriva zavisnosti napona od primenjene deformacije za alginatni hidrogel koja je tipična za viskoelastične gelove i koja se sastoji od linearne i nelinearne oblasti i oblasti loma (*Zhang i sar., 2007, Junter i Vinet, 2009*). Pokazano je da kada se na alginatni hidrogel primeni deformacija manja od 8 % alginat se ponaša kao linearni elastični materijal, dok pri većim deformacijama dolazi do viskoelastičnog ponašanja hidrogela, odnosno nelinearnosti (*Mancini i sar., 1999*).



**Slika 1.20.** Tipična zavisnost napona od primenjene deformacije alginatnog hidrogela u obliku diska. Prikazane su vrednosti parametara ( $\sigma_f$ , napon pri lomu;  $W_f$ , energija loma;  $E$ , Jangov modul elastičnosti) za alginatne diskove (2 mas.%) dobijene geliranjem u 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  na 4°C u toku 2 h. Određivanje Jangovog modula elastičnosti u linearnoj oblasti krive napona u zavisnosti od primenjene deformacije ( $\leq 10\%$ ) je prikazano u insertu A (Junter i Vinet, 2009)

Uobičajene metode određivanja mehaničkih svojstava podrazumevaju podvrgavanje hidrogelova u ravnotežnom stanju naponu kompresije ili istežanja. Tako se pri testiranju hidrogelova pri malim deformacijama, dobijaju linearne zavisnosti napona od primenjene deformacije, iz čijih nagiba se mogu dobiti vrednosti modula elastičnosti,  $E$  (Zhang i sar., 2007, Junter i Vinet, 2009). Ove metode, međutim, zahtevaju žrtvovanje uzoraka što u gajenju tkiva nameće potrebu gajenja velikog broja uzoraka. Zato je u određenim biorektorskim sistemima omogućeno određivanje i praćenje biomehaničkih karakteristika uzoraka u toku gajenja bez potrebe za prekidanje kulture.

Kao primer može se navesti pomenuti protočni, biomimični bioreaktor sa dinamičkom kompresijom (slika 1.16F) u kome je omogućeno ispitivanje biomaterijala u uslovima koji se mogu podesiti da imitiraju prirodnu *in vivo* sredinu tkiva artikularne hrskavice ili tkiva kosti (frekvencija 0,1-1 Hz, deformacija 5-10 %, intersticijalna brzina 10-100  $\mu\text{m/s}$ ) (Petrović i sar.,

2009). Dobijene vrednosti modula elastičnosti alginatnih hidrogelova pri deformaciji od 10 % i frekvenciji od 0,56 Hz u tom bioreaktoru su bile u opsegu vrednosti koje su objavljene u literaturi kada su za određivanje mehaničkih karakteristika korišćeni merni instrumenti za tu namenu (Stojkowska i sar., 2010). Ovi rezultati su praktično potvrdili mogućnost primene bioreaktora za približno određivanje mehaničkih karakteristika biomaterijala, kao i tkiva. Takođe, je pokazana mogućnost da se bioreaktor koristi i za praćenje biomehaničkih karakteristika biomaterijala u toku dugoročnih višenedeljnih ispitivanja u uslovima koji imitiraju prirodnu *in vivo* sredinu (Stojkowska i sar., 2010). Ova ispitivanja mogu da obezbede predviđanje ponašanja biomaterijala prilikom primene ili implantacije.

Funkcija nanočestica srebra je antimikrobna aktivnost koja se najčešće određuje primenom agar difuzione metode (Ruparelia i sar., 2008) i dilucione metode (Panáček i sar., 2009). Agar difuziona metoda se zasniva na principu difuzije nanočestica i jona srebra kroz čvrstu hranljivu podlogu (agar) prethodno zasejanu ispitivanom kulturom mikroorganizma. Glavni nedostatak ove metode je limitirana difuzija srebra kroz čvrstu agarnu strukturu. Dilucioni metod se, sa druge strane, zasniva na nizu dvostrukih razblaženja ispitivanog biomaterijala u odgovarajućoj podlozi, najčešće bujonu, pri čemu je koncentracija bakterija ista u svim razblaženjima. Ovim testom se prevazilazi problem difuzione limitacije i može se odrediti minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), kao i minimalna baktericidna koncentracija (MBK). MIK je najniža koncentracija antimikrobnog agensa kojom se inhibira vidljiva proliferacija mikroorganizama nakon inkubacije tokom noći, dok je MBK najniža koncentracija antibakterijskog agensa koja deluje letalno na datu bakterijsku vrstu.

Antimikrobna aktivnost nanokompozitnih biomaterijala sa nanočesticama srebra je najčešće ispitivana prema *Staphylococcus aureus* (Dubas i sar., 2011), *Staphylococcus epidermidis* (Agarwal i sar., 2010), *Escherichia coli* (Varaprasad i sar., 2010), *Bacillus subtilis* (Ruparelia i sar., 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (Travan i sar., 2009), kao i *Candida* spp. (Panáček i sar., 2009).

Kinetika otpuštanja srebra je značajna sa stanovišta povezivanja citotoksičnog i antimikrobnog efekta sa karakteristikama nanokompozita. Pri tome je posebno važno izvesti ispitivanja funkcionalnosti i kinetike otpuštanja srebra u istim uslovima. Tako je ispitivana kinetika otpuštanja srebra iz mikročestice na bazi Ca-alginata i hitozana sa inkorporisanim nanočesticama srebra u 15 mM rastvoru NaCl pokazala da se svega 2,6 % ukupne koncentracije srebra u mikročesticama otpusti za 5 nedelja (*Travan i sar., 2009*). Međutim, u navedenom ispitivanju nije uzeto u obzir da nanočestice i joni srebra mogu da reaguju sa jonima hlora, pri čemu srebro-hlorid brzo precipitira dajući slabo rastvornu so.

Iako *in vitro* studije pružaju važne fundamentalne informacije o određenim interakcijama između ćelija i biomaterijala ne mogu da zamene u potpunosti *in vivo* studije. *In vivo* studije su neophodne kako bi se ispitalo ponašanje materijala u prisustvu različitih tipova ćelija i ekstracelularnog matriksa, kao i pod dejstvom endokrinih faktora koji deluju na ćelije oko materijala. Pri ispitivanju materijala za obloge za rane najčešće se koriste modeli opekotina na miševima (*Dia i sar., 2009*) i pacovima (*Acar i sar., 2011, Akhoondinasab i sar., 2014*), kao i hirurške rane na miševima (*Dunnu i sar., 2013*), pacovima (*Marie Arockianathan i sar., 2012*) i svinjama (*Wang i sar., 2001*). Kao komplikovaniji model za ispitivanje funkcionalnosti biomaterijala najčešće se koristi model nekroze na pacovima (*Murakami i sar., 2010*). Nekrotične rane se najčešće indukuju intradermalnim ubrizgavanjem citostatika kao što su doksorubicin (*Kesic i sar., 2010*) i mitomicin C (*Murakami i sar., 2010*).



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bio ispitivanje mogućnosti dobijanja hidrogelova u različitim oblicima iz koloidnih rastvora alginata sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra i sveobuhvatna karakterizacija dobijenih nanokompozitnih hidrogelova za potencijalnu biomedicinsku primenu u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

Istraživanja su uključivala nekoliko celina:

- ispitivanje stabilnosti koloidnih rastvora alginata sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra;
- ispitivanje mogućnosti mešanja Ag/alginatnih koloidnih rastvora sa različitim polimerima;
- utvrđivanje mogućnosti dobijanja nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata u više različitih geometrijskih oblika kao što su diskovi, mikročestice i mikrovlakna;
- ispitivanje mogućnosti sušenja i rehidratacije nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata uz očuvanje inkorporisanih nanočestica srebra;
- određivanje biomehaničkih karakteristika nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata u biomimičnim biorektorskim uslovima;
- određivanje citotoksičnosti odabranih nanokompozitnih hidrogelova u ćelijskim kulturama, kao i ćelijskoj kulturi gajenoj u biomimičnim uslovima u biorektoru;
- određivanje antimikrobne aktivnosti odabranih nanokompozitnih hidrogelova;
- određivanje efikasnosti odabranih nanokompozitnih biomaterijala na bazi alginata i nanočestica srebra za zarastanje rana na modelu opekotina II stepena kod miševa i pacova;
- određivanje efikasnosti odabranih nanokompozitnih alginatnih hidrogelova za zarastanje hroničnih rana na modelu nekroze kod pacova.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

U ovom radu korišćeni su Na-alginat niskog viskoziteta (*A-2158, Sigma, St. Louis, MO, SAD* i *A3249, AppliChem, Darmstadt, Nemačka*), Na-alginat srednjeg viskoziteta (*A-2033, Sigma, St. Louis, MO, SAD*), poli(vinil alkohol) (PVA) rastvorljiv u vrućoj vodi (*P1763, Sigma, St. Louis, MO, SAD*), poli(vinil pirolidon) (PVP,  $M_r = 40,000$ , *Sigme, St. Louis, MO, SAD*), kao i bagremov med (*Rančić Svetislav, Obrenovac, Srbija*).

Takođe, korišćeni su srebro-nitrat (*M. P. Hemija, Beograd, Srbija*), kalijum-nitrat (*Centrohem, Stara Pazova, Srbija*), kalcijum-nitrat tetrahidrat (*Centrohem, Stara Pazova, Srbija*), kalcijum-hlorid dihidrat (*A0313949, Acros Organics, New Jersey, SAD*), natrijum-citrat dihidrat (*6132-04-3, SAFC, St. Louis, MO, SAD*), izopropanol (*Zorka Pharma, Šabac, Srbija*), azotna kiselina (65 %, *Zorka Pharma, Šabac, Srbija*), i amonijum hidroksid (25 %, *NRK Inženjering, Beograd, Srbija*).

U eksperimentima sa ćelijskim kulturama korišćeni su *Dulbecco* modifikovan *Eagle* medijum (DMEM), hranljivi medijum RPMI 1640, fetalni goveđi serum (FBS), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES), natrijum-dodecil sulfat (SDS), fosfatno-puferisan fiziološki rastvor (PBS), etilen-diamin-tetraacetatna kiselina (EDTA), dimetilnazoldifenil-tetrazolijum-bromid (MTT), tripan plavo (*trypan blue*) i prolin (svi kupljeni od *Sigma, St. Luis, SAD*). Takođe, korišćeni su penicilin, streptomycin, tripsin (svi kupljeni od *PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austrija*), kolagenaza tip II (*Worthington, Freehold, NJ, SAD*), fitohemaglutinin (*INEP, Beograd, Srbija*), askorbinska kiselina u ampuli (*Galenika, Beograd, Srbija*), kao i askorbinska kiselina u tableti (*EkoFarm, Novi Sad, Srbija*).

U eksperimentima određivanja antimikrobne aktivnosti korišćeni su natrijum-hlorid (*Superlab, Beograd, Srbija*), tripton kupljen od Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak (*Beograd, Srbija*) i ekstrakt kvasca

(*bioMerieux, Madrid, Španija*). Bakterijska kultura *Staphylococcus aureus* TL je dobijena od Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Univerzitet u Nišu (*Leskovac, Srbija*), dok je *Escherichia coli* ATCC 25922 kupljena od *American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD)*. Korišćene su sledeće podloge: hranljivi bujon i BH bujon (*brain heart broth*), Bird Parker (*Baird-Parker*) agar, Mek Konki (*Mac Conkey*) agar i Miler Hinton (*Mueller-Hinton*) agar, svi proizvodi su kupljeni od Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak (*Beograd, Srbija*).

U *in vivo* ekperimentima su korišćeni: ketamin (*Ketamidol<sup>®</sup>, Richter Pharma ag, Vels, Austrija*), ketoprofen (*Rycarfa<sup>®</sup>, Krka, Zagreb, Hrvatska*), doksorubicin (*Adriblastina<sup>®</sup> RD, Actavis, Italija*), Sanaderm<sup>®</sup> krem (*Zdravlje A.D., Leskovac, Srbija*), Vivamel<sup>®</sup> obloge (*Tosama, Domžale, Slovenija*) i Suprasorb<sup>®</sup>A+Ag obloge (*Lohmann & Rauscher, Beč, Austrija*).

Za histološku analizu preparata korišćeni su formalin (*Zorka Pharm, Šabac, Srbija*), hematoksilin-eozin (*Sigma, St. Louis, MO, SAD*) i trihrom Mason (*Bio-Optica, Milano, Italija*).

### 3.2. SINTEZA Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH RASTVORA

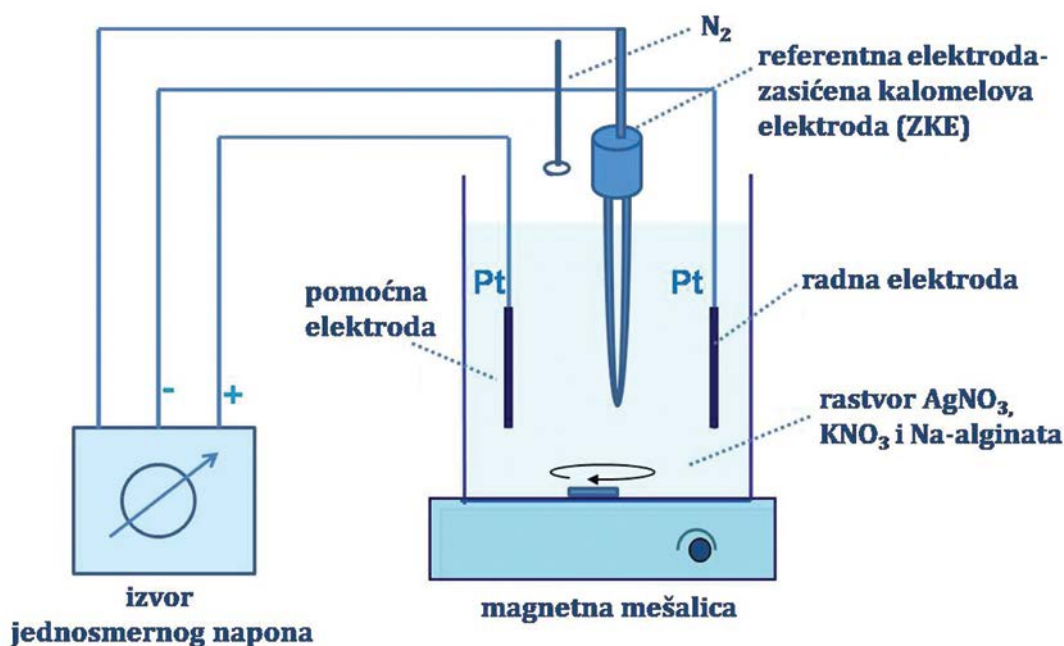
Natrijum-alginatni rastvori sa nanočesticama srebra su dobijeni novom elektrohemijskom metodom.<sup>1</sup> Nanočestice srebra su elektrohemijski sintetisane u vodenim rastvorima koji su sadržali 0,1 M KNO<sub>3</sub>, 3,9 mM AgNO<sub>3</sub>, i 2 mas.% Na-alginat. Za galvanostatsku sintezu je korišćen *Gamry Reference 600* potenciostat/galvanostat/ZRA (*Gamry Instruments, Warminster, PA, SAD*), u elektrohemijskoj ćeliji sa radnom Pt elektrodom (Pt pločica dimenzija 9 x 10 mm), pomoćnom Pt elektrodom (Pt pločica dimenzija 10 x 13 mm) i zasićenom kalomelovom elektrodom (ZKE) kao referentnom. Sinteza je izvođena uz stalno

---

<sup>1</sup> Obradović B., Mišković-Stanković V., Jovanović Ž., Stojkowska J., Dobijanje mikročestica hidrogela alginata sa inkorporisanim nanočesticama srebra, (Production of alginate microbeads with incorporated silver nanoparticles), patent br. RS53508 (B1), Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije, od 27.02.2015.

mešanje, pri gustini struje od  $50 \text{ mA/cm}^2$  i pri vremenu implementacije od 10 min. Rastvor je izlagan protoku azota 20 min pre početka sinteze, kao i tokom sinteze.

Na slici 3.1. je prikazana elektrohemijaska ćelija korišćena za sintezu nanočestica srebra stabilisanih u rastvoru alginata.



**Slika 3.1.** Šematski prikaz eksperimentalne aparature za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra: u elektrohemijskoj ćeliji sa vodenim rastvorom  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{AgNO}_3$ , i Na-alginata se nalaze radna Pt elektroda, pomoćna Pt elektroda i zasićena kalomelova elektroda (ZKE) kao referentna elektroda. Galvanostatska sinteza je izvedena u elektrohemijskoj ćeliji uz stalno mešanje vodenog rastvora i atmosferi azota

U toku elektrohemijske sinteze je utvrđeno da dolazi do blagog taloženja alginatnog gela, tako da se koncentracija alginata u koloidnom rastvoru tokom sinteze smanjuje na 1,7–1,9 mas.%, u zavisnosti od vrste alginata koji je korišćen za sintezu. Radi dobijanja alginatnih koloidnih rastvora sa različitim koncentracijama nanočestica srebra, početno sintetisani koloidni rastvor je razblažen rastvorom Na-alginata odgovarajuće koncentracije.

Ag/alginatni koloidni rastvori su sterilisani ključanjem uz mešanje na magnetnoj mešalici u toku 30 min.

### 3.3 ISPITIVANJE STABILNOSTI Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH RASTVORA

Stabilnosti Ag/alginatnih koloidnih rastvora je ispitivana u više eksperimentalne serija sa i bez dodatih komponenti.

U prvoj eksperimentalnoj seriji elektrohemijski sintetisani Ag/alginatni koloidni rastvori (koncentracija nanočestica srebra 3,9 mM i alginata 1,9 mas.%) su praćeni u toku vremena merenjem intenziteta apsorbanca na talasnoj dužini od 405 nm.

U drugoj eksperimentalnoj seriji ispitan je uticaj sterilizacije ključanjem na stabilnost nanočestica. Ag/alginatni koloidni rastvor (3,9 mM) je razblažen sa 1,73 mas.% Na-alginatom (alginat srednjeg viskoziteta u oba rastvora) tako da je finalna koncentracija nanočestica srebra u koloidnom rastvoru bila 1 mM. Razblaženi koloidni rastvor je sterilisan ključanjem 30 min, a zatim je meren intenzitet apsorbanca na relevantnim talasnim dužinama.

U narednim eksperimentalnim serijama elektrohemijski dobijeni Ag/alginatni koloidni rastvori su razblaživani uz dodatak različitih komponenata radi snižavanja pH vrednosti, a zatim je praćena stabilnost dobijenih koloidnih smeša u toku vremena. Izvedeno je 7 eksperimentalnih serija ovim pristupom.

i) Ag/alginatni koloidni rastvor (3,9 mM) je razblažen sa 1,73 mas.% Na-alginatom (alginat srednjeg viskoziteta u oba rastvora) i sterilisan ključanjem nakon čega je u ohlađeni koloidni rastvor dodata askorbinska kiselina tako da finalne koncentracije askorbinske kiseline i nanočestica srebra budu 0,1 mg/ml i 1 mM, redom. Ukratko, tableta askorbinske kiseline, koja sadrži 500 mg askorbinske kiseline, je rastvorena u 40 ml destilovane vode, tako da je finalna koncentracija askorbinske kiseline u rastvoru 12,5 mg/ml. Rastvor askorbinske kiseline je profiltriran kroz filter papir, a zatim sterilisan filtriranjem kroz filter papir sa porama od 0,2  $\mu$ m i dodat u koloidni rastvor.

ii) Ag/alginatni koloidni rastvor (3,9 mM) razblažen je sa 1,85 mas.% Na-alginatom (alginat srednjeg viskoziteta u oba rastvora) do koncentracije nanočestica srebra od 1,05 mM. U razblaženi koloid je nakon sterilizacije i hlađenja dodat med. Dobijena smeša je nominalno sadržala 1 mM nanočestica srebra, 1,73 mas.% alginata i 5 mas.% meda.

iii) Ag/alginatni koloidni rastvor (3,9 mM) razblažen je sa 2,0 mas.% Na-alginatom (alginat srednjeg viskoziteta u oba rastvora) do koncentracije nanočestica srebra od 1,11 mM. U razblaženi koloid je nakon sterilizacije i hlađenja dodat med. Dobijena smeša je nominalno sadržala 1 mM nanočestica srebra, 1,73 mas.% alginata i 10 mas.% meda.

iv) Ag/alginatni koloidni rastvor (3,9 mM) razblažen je sa 2,37 mas.% Na-alginatom (alginat srednjeg viskoziteta u oba rastvora) do koncentracije nanočestica srebra od 1,25 mM. U razblaženi koloid je nakon sterilizacije i hlađenja dodat med. Dobijena smeša je nominalno sadržala 1 mM nanočestica srebra, 1,73 mas.% alginata i 20 mas.% meda.

v) Ag/alginatni koloidni rastvor (3,9 mM) razblažen je sa 2,9 mas.% Na-alginatom (alginat srednjeg viskoziteta u oba rastvora) do koncentracije nanočestica srebra od 1,43 mM. U razblaženi koloid je nakon sterilizacije i hlađenja dodat med. Dobijena smeša je nominalno sadržala 1 mM nanočestica srebra, 1,73 mas.% alginata i 30 mas.% meda.

vi) Ag/alginatni koloidni rastvor (3,9 mM) je razblažen sa 3,74 mas.% Na-alginatom (alginat srednjeg viskoziteta u oba rastvora), tako da koncentracija nanočestica srebra bude 1,67 mM. Nakon sterilizacije i hlađenja u razblaženi koloidni rastvor je dodat med. Dobijena smeša je nominalno sadržala 1 mM nanočestica srebra 1,73 mas.% Na-alginata i 40 mas.% meda.

vii) Ag/alginatni koloidni rastvor (3,9 mM) je razblažen sa 5,3 mas.% Na-alginatom (alginat srednjeg viskoziteta u oba rastvora), tako da koncentracija nanočestica srebra bude 2 mM. Nakon sterilizacije i hlađenja u razblaženi koloidni rastvor je

dodat med. Dobijena smeša je nominalno sadržala 1 mM nanočestica srebra 1,73 mas.% Na-alginata i 50 mas.% meda.

Stabilnost ovako pripremljenih uzoraka je praćena u toku vremena merenjem intenziteta apsorbance, kao i pH vrednosti pomoću pH metra (*InoLab ph/Cond 720, WTW GmbH, Weilheim, Nemačka*). Svaka grupa je raćena u triplikatu. Takoće, kao kontrola, izmereni su i apsorpcioni spektri, 1,9 mas.% rastvora Na-alginata i ćistog meda i 0,1 mg/ml askorbinske kiseline, kao i njihove pH vrednosti.

#### 3.4 ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI MEŠANJA Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH RASTVORA SA RAZLIĆITIM POLIMERIMA

Ag/alginatni koloidni rastvori dobijeni elektrohemijском sintezom su mešani sa rastvorima PVA i PVP do željene koncentracije kako bi se dobili PVA/Ag/alginatni i PVP/PVA/Ag/alginatni koloidni rastvori. Ukratko, prah PVA je rastvoren u vrućoj vodi ( $T \sim 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mešanjem u toku 2 h tako da se dobije koncentracija od 17 mas.%. Takoće, prah PVP je rastvoren u vrućoj vodi ( $T \sim 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ) uz mešanje u toku 2 h do koncentracije od 35 mas.%. Dobijeni rastvori su zatim mešani sa 3,9 mM Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (1,9 mas.% alginat niskog viskoziteta) kako bi se dobili rastvori sa finalnim koncentracijama: i) 5,6 mas.% PVA, 1,3 mas.% Na-alginata i 2,6 mM nanočestica srebra, ii) 5,6 mas.% PVP, 1,3 mas.% Na-alginata i 2,6 mM nanočestica srebra, i iii) 11 mas.% PVA, 5 mas.% PVP i 0,4 mas.% Na-alginata i 0,8 mM nanočestica srebra.

Prisustvo nanočestica srebra u svim rastvorima je potvrćeno UV-vidljivom spektroskopijom.

#### 3.5 DOBIJANJE NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA U OBLIKU DISKOVA

PVA/Ag/alginatni i PVP/PVA/Ag/alginatni diskovi su dobijeni tehnikom zamrzavanja-odmrzavanja uz dodatno geliranje pomoću kalcijum-nitrata. Ukratko, dobijeni rastvori PVA/Ag/alginata i PVP/PVA/Ag/alginata kako je to opisano u prethodnom odeljku (odeljak 3.4) su razliveni u posude sa 6, odnosno 12 bunarića,

a zatim su podvrgnuti ciklusima zamrzavanja-odmrzavanja. Uzorci su zamrzavani na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/24\text{ h}$ , a zatim su odmrzavani na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ h}$ . Nakon 4 ciklusa odmrzavanja-zamrzavanja došlo je do formiranja hidrogelova. Da bi geliranja bilo potpuno u svaki bunarić je dodato po 1-2 ml rastvora za geliranje (3 mas.%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ). Nakon 1 h formirani diskovi su izvađeni, a zatim isprani destilovanom vodom i korišćeni za dalja ispitivanja. Dobijeni nanokompozitni diskovi su bili prečnika

12 mm i debljine 4 mm (PVA/Ag/alginatni diskovi), odnosno prečnika 12 mm i debljine 4,5 mm (PVP/PVA/Ag/alginatni diskovi). Kao kontrola su na isti način u 4 ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja napravljeni i diskovi od 5,6 mas.% rastvora PVA (prečnik 12 mm i debljina 4 mm).

Ista procedura je takođe primenjena i na PVP/Ag/alginatni koloidni rastvor, ali nije došlo do geliranja, tako da ova smeša nije korišćena u daljim ispitivanjima.

### 3.6 DOBIJANJE NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA U OBLIKU MIKROČESTICA

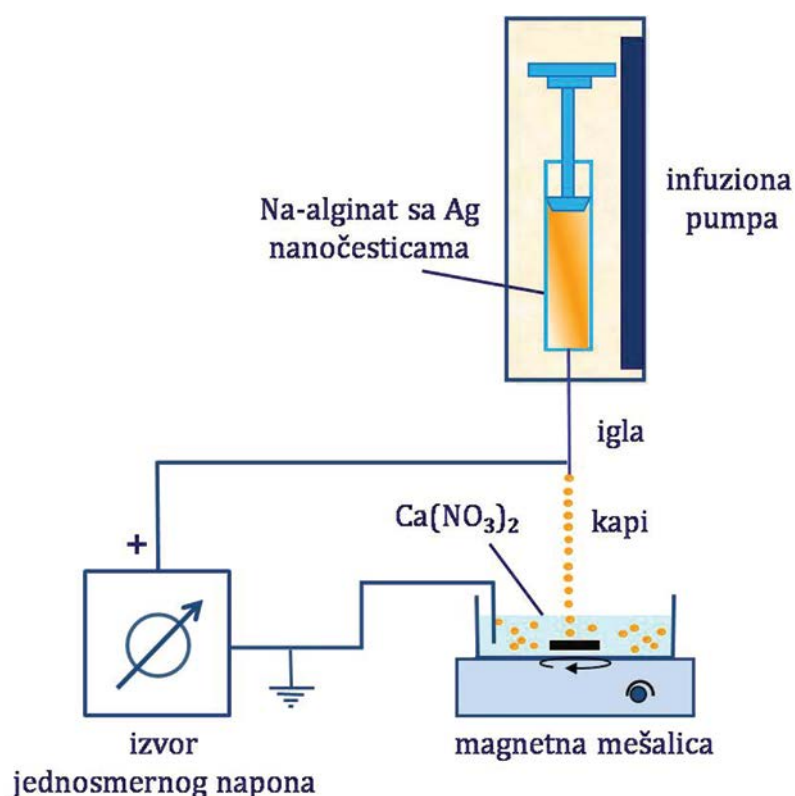
Natrijum alginatni koloidni rastvor sa nanočesticama srebra je korišćen za dobijanje Ag/alginatnih mikročestica elektrostatičkom ekstruzijom.<sup>2</sup> Ag/alginatni koloidni rastvori sa različitim koncentracijama nanočestica srebra su potiskivani kroz pozitivno naelektrisanu iglu od nerđajućeg čelika uz pomoć infuzione pumpe za potiskivanje tečnosti (*Racel, Scientific Instruments, Stamford, CT, SAD*). Korišćena je igla prečnika 23 G sa ravnim vrhom (*Small Parts, Inc., SAD*); rastojanje između vrha igle i rastvora za geliranje (1,5 mas.%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) je iznosilo oko 2,5 cm, a elektrostatički napon, između vrha igle i rastvora za geliranje je bio u opsegu od 6-7 kV. Konstantan protok rastvora Ag/alginata je bio 25,2 ml/h uz korišćenje šprica na pumpi od 5 ml, odnosno 39,3 ml/h uz korišćenje šprica od 10 ml. Iz generatora visokog napona (*Model 30R, Bertan Associates, Inc., New York, SAD*) izvedena je pozitivna elektroda i povezana sa iglom, a u rastvor za geliranje uronjena je uzemljena elektroda (slika 3.2). Na taj način se između vrha igle i

---

<sup>2</sup> Obradović B., Mišković-Stanković V., Jovanović Ž., Stojkowska J., Dobijanje mikročestica hidrogela alginata sa inkorporisanim nanočesticama srebra, (Production of alginate microbeads with incorporated silver nanoparticles), patent br. RS53508 (B1), Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije, od 27.02.2015.



rastvora kalcijum-nitrata stvaralo određeno električno polje, pa se rastvor, potiskivan pumpom kroz špric, od vrha igle otkidao u vidu mlaza sitnih naelektrisanih kapljica pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile. Kapljice su sakupljane u rastvoru za geliranje mešanom na magnetnoj mešalici, pri čemu je dolazilo do razmene jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  i očvršćavanja kapi u obliku sferičnih čestica. Čestice su nakon formiranja ostavljene da geliraju još 30 min, uz mešanje. Nakon toga, Ag/alginate mikročestice su isprane  $\text{dH}_2\text{O}$ , kako bi se uklonili zaostali joni srebra, i dalje su korišćene u eksperimentalnim istraživanjima.



**Slika 3.2.** Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije: koloidni rastvor natrijum-alginata sa nanočesticama srebra se potiskuje uz pomoć infuzione pumpe kroz pozitivno naelektrisanu iglu povezanu sa pozitivnom elektrodom izvedenom iz generatora visokog napona, a nastale kapljice se skupljaju u uzemljenom rastvoru  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  mešanom na magnetnoj mešalici. Između vrha igle i rastvora  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  se stvara električno polje, pa se rastvor, potiskivan pumpom kroz špric, od vrha igle otkida u obliku mlaza sitnih naelektrisanih kapljica pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile. U rastvoru

za geliranje dolazi do razmene jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  i očvršćavanja kapi u obliku sferičnih čestica

U cilju ispitivanja uticaja primenjenog napona tokom elektrostatičke ekstruzije na redukciju  $\text{Ag}^+$  koji su zaostali u koloidnom rastvoru nakon elektrohemijske sinteze, Ag/alginatni koloidni rastvor (3,9 mM) je potiskivan kroz pozitivno naelektrisanu iglu pri naponu u opsegu od 0-7,5 kV i konstantnom rastojanju između elektroda, u Petrijevu šolju bez rastvora za geliranje. Nakon elektrostatičke ekstruzije meren je intenzitet apsorbnace Ag/alginatnog koloidnog rastvora na talasnoj dužini od 405 nm i poreden sa intenzitetom apsorbnace početnog Ag/alginatnog koloidnog rastvora.

U cilju ispitivanja uticaja parametara elektrostatičke ekstruzije na veličinu Ag/alginatnih mikročestica, izvedene su dve eksperimentalne serije. U prvoj eksperimentalnoj seriji dobijene su mikročestice elektrostatičkom ekstruzijom Ag/alginatnog koloidnog rastvora (3,9 mM) pri naponu u opsegu od 0-7,5 kV i konstantnom protoku od 25,2 ml/h. U drugoj eksperimentalnoj seriji mikročestice su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom Ag/alginatnog koloidnog rastvora (3,9 mM) pri protoku u opsegu od 5,1 do 25,2 ml/h i konstantnom naponu od 6,6 kV.

Na isti način primenom elektrostatičke ekstruzije dobijene su Ag/alginatne mikročestice sa medom. Ukratko, smeša Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa medom (koncentracija nanočestica srebra 1 mM, Na-alginata 2 mas.% i meda 10 mas.%) je potiskivana kroz iglu prečnika 23 G sa ravnim vrhom. Rastojanje između vrha igle i rastvora za geliranje (3 mas.%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) je bilo 2,5 cm, dok je elektrostatički napon iznosio 7,2 kV, a protok smeše 39,2 ml/h. Čestice su nakon formiranja ostavljene da geliraju još 30 min, uz mešanje. Nakon toga, Ag/alginatne mikročestice sa medom su isprane  $\text{dH}_2\text{O}$ , kako bi se uklonili zaostali joni srebra, i dalje su korišćene u eksperimentalnim istraživanjima.

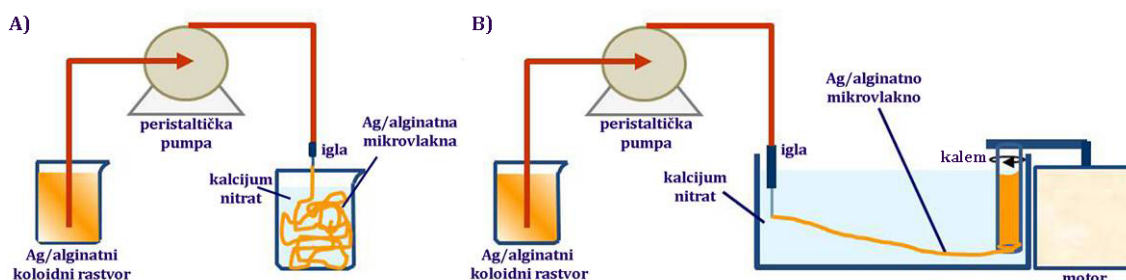
PVA/Ag/alginatne/mikročestice su takođe dobijene primenom elektrostatičke ekstruzije. Ukratko, smeša sa 1,3 mas.% Na-alginata, 2,6 mM

nanočestica srebra i 5,6 mas.% PVA je potiskivana kroz iglu prečnika 23 G sa ravnim vrhom; rastojanje između vrha igle i rastvora za geliranje (3 mas.%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) je bilo u opsegu od 2,5 do 10 cm, dok je elektrostatički napon bio u opsegu od 6-8 kV. Nakon 30 min geliranja PVA/Ag/alginate/čestice su potvrđene ciklusima zamrzavanja–odmrzavanja bez tečnosti. Čestice su prvo bile zamrzavane u zamrzivaču 24 h na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , a zatim su odmrzavane u frižideru  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 5 h. Ovaj postupak je ponovljen 4 puta.

### 3.7 DOBIJANJE NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA U OBLIKU MIKROVLAKANA

Ag/alginate mikrovlakna su dobijena ekstruzijom, kao što je prethodno opisano (*Vidović i sar., 2012*). Ukratko, elektrohemijski sintetisan Ag/alginate koloidni rastvor razblažen Na-alginatom do željene koncentracije je potiskivan pomoću peristatičke pumpe (*Berh Labor-Technik, Düsseldorf, Germany*) konstantnim protokom od  $18,0 \pm 0,2\text{ ml/min}$  kroz iglu od nerđajućeg čelika sa ravnim vrhom (23 G) smeštenom na rastojanju od 1 cm iznad rastvora za geliranje (3 mas.%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) (slika 3.3A). U rastvoru se sakuplja mlaz Ag/alginate koloidnog rastvora koji očvršćava formirajući nerastvorna mikrovlakna usled izmene jona  $\text{Na}^+$  jonima  $\text{Ca}^{2+}$ . Mikrovlakna su ostavljena u rastvoru za geliranje još 2 h, da bi došlo do potpunog geliranja, a zatim su isprana u destilovanoj vodi, kako bi se uklonili zaostali joni srebra.

Takođe, na isti način su dobijena Ag/alginate mikrovlakna sa medom pri čemu je korišćen 12 mas.%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  da bi mikrovlakna brže i bolje gelirala.



**Slika 3.3.** Šematski prikaz eksperimentalne aparature za dobijanje mikrovlakana.

A) Ag/alginatni koloidni rastvor se potiskuje uz pomoć peristaltičke pumpe kroz iglu koja je iznad rastvora  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Nastali mlaz u rastvoru  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  očvršćava formirajući mikrovlakna. B) Ag/alginatni koloidni rastvor se potiskuje uz pomoć peristaltičke pumpe kroz iglu koja je uronjena u rastvor  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Nastali mlaz očvršćava formirajući mikrovlakna koja se namotavaju na kalem i istežu se

U cilju dobijanja mikrovlakana manjeg prečnika, u rastvor za geliranje je postavljen kalem (prečnik 18 mm) koji se okreće konstantnom brzinom uz pomoć motora. U ovom slučaju se Ag/alginatni koloidni rastvor istiskuje konstantnim protokom  $12,7 \pm 0,1$  ml/min kroz iglu od nerđajućeg čelika sa ravnim vrhom (23 G) koja je uronjena u rastvor za geliranje (3 mas.%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ). Očvrstnuo vlakno se namotava na kalem i isteže da bi se formirala mikrovlakna kao što je prikazano na slici 3.3B. Nakon 2 h dobijena mikrovlakna su isprana destilovanom vodom.

Ag/alginatna mikrovlakna sa medom su dobijena ekstruzijom uz istezanje na isti način uz to da je za geliranje korišćen rastvor 12 mas.%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  kako bi se geliranje ubrzalo i smanjili gubici meda.

### 3.8 DOBIJANJE I REHIDRATACIJA SUVIH NANOKOMPOZITNIH MIKROČESTICA

Ag/alginatne mikročestice sa različitim koncentracijama nanočestica srebra su sušene na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Mogućnosti rehidracije suvih Ag/alginatnih mikročestica sa koncentracijom nanočestica srebra od  $4,87 \pm 0,05$  mM su ispitivane u dve eksperimentalne serije korišćenjem fiziološkog rastvora (0,9 mas.% NaCl) i  $\text{dH}_2\text{O}$ .

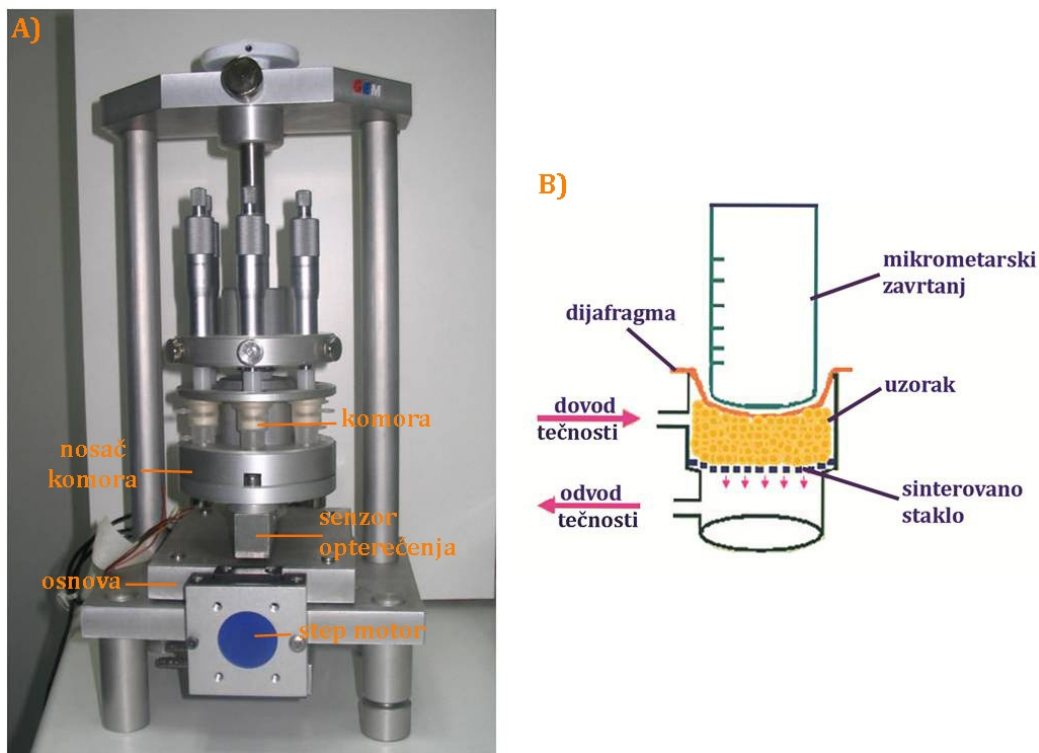
U prvoj eksperimentalnoj seriji, Ag/alginatne mikročestice (0,2 g) su sušene do konstantene mase na sobnoj temperaturi, a zatim su potopljene u 5 ml fiziološkog rastvora na sobnoj temperaturi. Vlažne Ag/alginatne mikročestice (0,2 g) su takođe potopljene u 5 ml fiziološkog rastvora i služile su kao kontrola.

U drugoj eksperimentalnoj seriji, Ag/alginatne mikročestice (0,1 g) su sušene do konstantene mase na sobnoj temperaturi, a zatim su potopljene u 3 ml dH<sub>2</sub>O na sobnoj temperaturi.

Rehidracija nanokompozitnih čestica je praćena merenjem mase i prečnika mikročestica u toku vremena.

### 3.9 ISPITIVANJE BIOMEHANIČKIH KARAKTERISTIKA NANOKOPMOZITNIH HIDROGELOVA

Novi biomimični bioreaktor sa dinamičkom kompresijom (*Petrović i sar., 2009*) je korišćen za određivanje biomehaničkih karakteristika nanokompozitnih hidrogelova kao što je ranije opisano (*Stojkovska i sar., 2010*). Ukratko, bioreaktor se sastoji od 6 komora za uzorke tkiva ili biomaterijala koje se smeštaju na nosač, koji se dalje pričvršćuje za metalnu osnovu (slika 3.4A). Nosač za komore može vertikalno da se pomera pomoću step-motora (*Superstep STP-MTR-23055, AutomationDirect, GA, SAD*). Ispod nosača je pričvršćen senzor opterećenja (*Scaime AL3C3SH5E, Scaime, Francuska*) koji omogućava merenje srednjeg opterećenja na svih 6 komora.



**Slika 3.4.** Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom. A) Nosač sa 6 komora je postavljen na osnovu koju pokreće step motor pričvršćen ispod osnove; opterećenje se meri senzorom opterećenja pričvršćenim ispod nosača komora. B) Šematski prikaz bioreaktorske komore sa priključcima za dovod i odvod medijuma u koju se smešta uzorak na sinterovano staklo i zatvara dijafragmom na koju naleže klip mikrometarski zavrtnj

Komore su cilindričnog oblika napravljene od polipropilena, na kome su dva otvora za dovod, odnosno odvod medijuma (slika 3.4B). Prostor u koji se smešta uzorak tkiva ili biomaterijal je prečnika 16 mm i visine 3 mm. Ukupna zapremina prostora u komori iznosi 0,6 ml. Uzorak koji se testira se postavlja na porozno sinterovano staklo (prečnik 13 mm), učvršćeno pomoću gumenog zaptivača, tako da tečnost prolazi direktno kroz uzorak. Komora za gajenje se zatvara dijafragmom od bergafleksa (*Termoplast DOO, Belgrad, Srbija*). Na dijafragmu naleže mikrometarski zavrtnj (prečnik 11 mm), koji omogućava precizno početno pozicioniranje u svakoj komori, nezavisno od debljine uzorka.

Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom je korišćen za određivanje biomehaničkih karakteristika nanokompozitnih diskova i mikročestica. Ispitivani

su PVA/Ag/alginatni diskovi (prečnik 12 mm i debljina 4 mm), PVP/PVA/Ag/alginatni diskovi (prečnik 12 mm i debljina 4,5 mm) i PVA diskovi (prečnik 12 mm i debljina 4 mm). Takođe, ispitivane su i biomehaničke karakteristike pakovanog sloja PVA/Ag/alginatnih čestica (prečnik  $1270 \pm 140 \mu\text{m}$ ), 1,5 mM Ag/alginatnih mikročestica (prečnik  $610 \pm 30 \mu\text{m}$ ), 2 mM Ag/alginatnih mikročestica (prečnik  $650 \pm 40 \mu\text{m}$ ), 3,9 mM Ag/alginatnih mikročestica (prečnik  $550 \pm 20 \mu\text{m}$ ) i alginatnih mikročestica (prečnik  $600 \pm 30 \mu\text{m}$ ). Kompresioni testovi su rađeni istovremeno u tri komore za gajenje i testiranje je vršeno u destilovanoj vodi. U svaku komoricu je stavljen po jedan disk, odnosno  $\sim 0,6$  g mikročestica tako da je visina pakovanog sloja iznosila 3 mm.

Uzorci su testirani pri deformaciji od 10 % u dva režima: i) pri brzini kompresije od  $337,5 \mu\text{m/s}$  i ii) pri stepenastom povećanju deformacije za  $50 \mu\text{m}$  za pakovani sloj i diskove debljine 4 mm, odnosno  $75 \mu\text{m}$  za diskove debljine 4,5 mm svakih 30 min. Sva merenja su ponovljena najmanje tri puta. Modul elastičnosti testiranih uzoraka pri oba režima rada bioreaktora je dobijen iz nagiba krive zavisnosti napona od primenjene deformacije uz uslov ispunjene linearnosti koja je očekivana pri malim deformacijama ( $\leq 10 \%$ ).

Maksimalna vrednost deformacije je zadata veličina, na osnovu koje se izračunava broj pomeraja osnove bioreaktora za dostizanje željene deformacije:

$$\text{deformacija} = \Delta l / l_0 \quad (3.1)$$

gde je  $\Delta l$  promena visine uzorka, a  $l_0$  inicijalna ili početna visina uzorka. Na osnovu zadatih vrednosti, za maksimalnu deformaciju, debljinu (visinu) uzorka i jednačine 3.1 određuje se promena visine uzorka ( $\Delta l$ ). Promena visine uzorka je direktno proporcionalna pomeraju osnove bioreaktora:

$$\Delta l = 1,25 \times N \quad (3.2)$$

gde je  $N$  broj pomeraja osnove bioreaktora, a 1,25 je vrednost jednog pomeraja osnove u  $\mu\text{m}$ . Vrednost za jedan pomeraj osnove bioreaktora dobijena je na osnovu činjenice da je minimalna vrednost pomeraja  $5 \mu\text{m}$ , odnosno 4 pomeraja osnove

bioreaktora (*Petrović i sar., 2009*). Na osnovu jednačine 3.2 dobijen je broj pomeraja koji osnova bioreaktora treba da izvrši da bi se postigla željena deformacija. Na osnovu jednačine 3.1 izračunava se deformacija za svaki pomeraj osnove sve dok se ne postigne maksimalna deformacija.

Pri testiranju uzoraka, senzor opterećenja pokazuje ukupan odziv koji predstavlja sumu odziva usled deformacije dijafragme i uzoraka. Od izmerenih vrednosti odziva senzora na dato opterećenje oduzete su vrednosti odziva pri deformaciji dijafragme, koji su prethodno određeni (*Stojkowska, 2010*). Na ovaj način dobija se odziv senzora usled deformacije uzorka u komori.

Vrednosti napona su zatim izračunate normalizovanjem vrednosti sile po površini poprečnog preseka klipa mikrometarskog zavrtnja:

$$\sigma = m \times g / A \quad (3.3)$$

gde je  $\sigma$  napon,  $m$  masa opterećenja senzora usled deformacije uzorka,  $g$  gravitaciono ubrzanje ( $9,81 \text{ m/s}^2$ ),  $A$  površina poprečnog preseka klipa mikrometarskog zavrtnja koja deluje na uzorak ( $9,5 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ ).

Moduli elastičnosti su određeni iz nagiba krive napon – deformacija kada su ove krive pratile linearni trend.

### 3.10 ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA

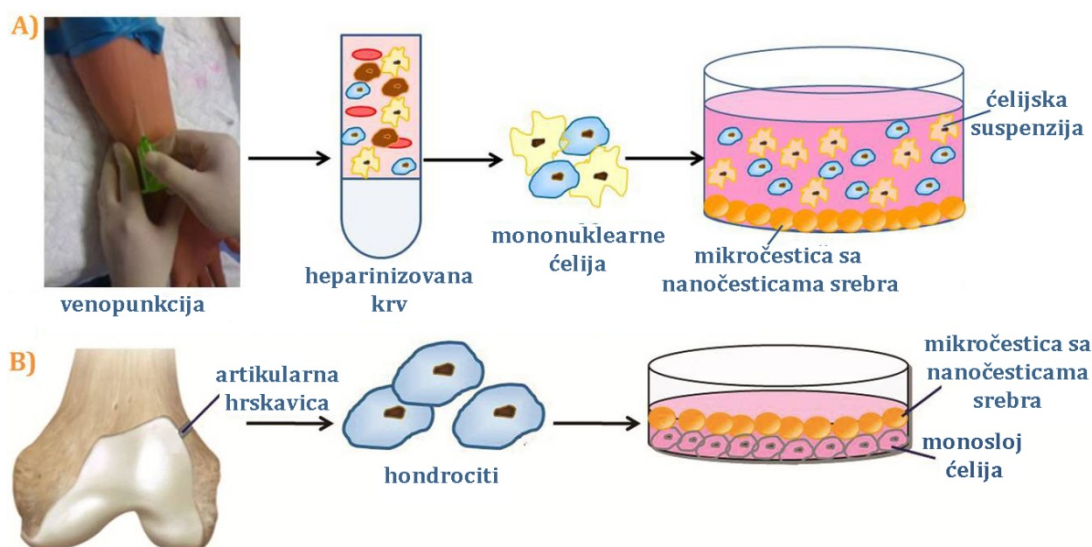
Citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra je ispitivana u 3 sistema za gajenje. Prvi sistem je predstavljao suspenziju humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi, a drugi sistem je predstavljao monosloj telećih hondrocita. Citotoksičnost u ova dva sistema je određena korišćenjem standardnog MTT testa. Treći sistem je predstavljao 3D kulturu telećih hondrocita imobilisanih u alginatne mikročestice i gajenih u perfuzionom bioreaktoru u prisustvu Ag/alginatnih mikročestica.



### 3.10.1 IZOLACIJA ČELIJA

#### 3.10.1.1 IZOLACIJA HUMANIH MONONUKLEARNIH ČELIJA PERIFERNE KRVI

Humane mononuklearne ćelije periferne krvi su izolovane iz pune heparinizovane krvi centrifugiranjem u gradijentu koncentracije pomoću separatora (*Lymphoprep<sup>TM</sup>*, *Nycomed, Oslo, Norveška*) (slika 3.5A). Čelije su isprane tri puta u rastvoru „Hemacel“. „Hemacel“ je vodeni rastvor (pH 7,4) koji sadrži 145 mM Na<sup>+</sup>, 5,1 mM K<sup>+</sup>, 6,2 mM Ca<sup>2+</sup>, 145 mM Cl<sup>-</sup> i 35 g/l želatinoznih polimera. Nakon ispiranja rastvor je odliven, a ćelijski talog je resuspendovan u hranljivom medijumu. Hranljivi medijum je bio RPMI 1640 (pH 7,2) uz dodatak 3 mM L-glutamina, 100 µg/ml streptomicina, 100 IU/ml penicilina, 25 mM rastvora, i HEPES 10 % fetalnog govedeg seruma, koji je termički inaktivisan na 56 °C tokom 30 minuta.



**Slika 3.5.** Šematski prikaz izolacije ćelija i studije citotoksičnosti. A) Studija citotoksičnosti u suspenziji humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi sa Ag/alginatnim mikročesticama: mononuklearne ćelije su izolovane iz pune heparinizovane krvi centrifugiranjem u gradijentu koncentracije pomoću separatora. B) Studije citotoksičnosti u monosloju hondrocita sa Ag/alginatnim mikročesticama: hondrociti su izolovani iz femuropatelarnih zglobova telica

### 3.10.1.2 IZOLACIJA TELEĆIH HONDROCITA IZ ARTIKULARNE HRSKAVICE

Artikularna hrskavica je izolovana u sterilnim uslovima iz femuropatelarnih zglobova telića starih 6, odnosno 12 meseci, 8 h od klanja (slika 3.5B). Izolovana hrskavica je zatim isprana u sterilnom fosfatnom puferu (PBS) i iseckana na komadiće površine 1–2 mm<sup>2</sup> i debljine oko 1 mm.

Eksplantati tkiva hrskavice su zatim digestirani pomoću kolagenaze tip II prema proceduri iz literature (*Freed i sar., 1993*). Tkivo je digestirano u 0,15 % rastvoru kolagenaze u DMEM sa dodatkom 10 % FBS u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> na tresilici tokom 18 h. Za digestiju 1 g tkiva hrskavice korišćeno je 15 ml rastvora kolagenaze. Uzorci su zatim filtrirani kroz sterilnu tkaninu da bi se odstranili komadići tkiva koji se nisu razgradili. Nakon toga je dodat rastvor PBS sa dodatkom 0,02 % EDTA da bi se zaustavio proces digestije. Digestat je centrifugiran na 1000 obrtaja u minuti tokom 10 min, a ćelijski talog je zatim resuspendovan u rastvoru PBS sa dodatkom 0,02 % EDTA i ponovo centrifugiran. Isti postupak je ponavljen tri puta nakon čega su hondrociti resuspendovani u medijumu za gajenje. Medijum za gajenje je bio DMEM koji sadrži 4,5 g/l glukoze, 0,584 g/l glutamina, uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 10 mM rastvora HEPES, 0,4 mM prolina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina i 50 µg/ml askorbinske kiseline.

Primarni hondrociti dobijeni iz hrskavice telića starih 6 meseci su korišćeni za ispitivanje citotoksičnosti u monosloju, dok su hondrociti dobijeni iz hrskavice junadi starih 12 meseci imobilisani u alginatne mikročestice i korišćeni za 3D gajenje u perfuzionom bioreaktoru što je opisano u sledećim odeljcima.

### 3.10.2 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra je ispitivana u suspenziji i monosloju ćelija korišćenjem MTT testa (*Mosmann, 1983, Eidi i sar., 2010*). Test je zasnovan na reakciji redukcije tetrazolijumske soli (dimetiltiazoldifenil-tetrazolijum-bromid, MTT) u

mitochondrijama pomoću većeg broja dehidrogenaza, pri čemu dolazi do cepanja tetrazolijumskog prstena i pojave formazana karakteristične plave boje. MTT mogu da redukuju samo aktivne mitohondrije živih ćelija, te je stoga ovaj test pogodan za merenje vijabilnosti ćelija i njihovog stanja aktivacije i proliferacije. Takođe, stepen redukcije MTT može biti pokazatelj i opšte metaboličke aktivnosti ćelija.

Preživljavanje ćelija je definisano kao odnos broja ćelija koje opstaju u prisustvu materijala koji se ispituje i broja ćelija u kontroli. Pošto je broj živih ćelija direktno proporcionalan apsorbanci rastvora, ćelijsko preživljavanje, S, može se izračunati kao:

$$S[\%] = A_u / A_c \cdot 100 \quad (3.4)$$

gde je  $A_u$  apsorbancia ćelija koje su gajene u prisustvu Ag/alginatnih mikročestica i  $A_c$  je apsorbancia ćelija iz kontrole. Citotoksičnost je određena prema skali: netoksično (> 90 % preživljavanje ćelija), slabo citotoksično (60–90 % preživljavanje ćelija), umereno citotoksično (30–59 % preživljavanje ćelija), i jako citotoksično ( $\leq$  30 % preživljavanje ćelija) (*Meriç Dahl i Eysteine Ruyter, 2008*).

### 3.10.3 ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI U SUSPENZIJI ĆELIJA

Citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra je ispitivana u suspenziji humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi (slika 3.5A) korišćenjem MTT testa (*Eidi i sar., 2010*). Suspenzija mononuklearnih ćelija periferne krvi je služila kao kontrola. Mikročestice (prečnik 700-800  $\mu\text{m}$ ) dobijene od Ag/alginatnih koloidnih rastvora sa različitim koncentracijama nanočestica srebra (0,5, 1 i 1,5 mM) elektrostatičkom ekstruzijom na način opisan u odeljku 3.6 su stavljene u ploču sa 96-bunarića, i to 10 mg mikročestica po bunariću. Zatim su dodate ćelije u koncentraciji od 150.000 ćelija u 150  $\mu\text{l}$  medijuma za gajenje u svaki bunarić. U posebnoj eksperimentalnoj seriji korišćeno je mitogena, fitohemaglutinin (*PHA-phytohaemagglutinin*) koji stimuliše proliferaciju ćelija, tako da finalna koncentracija fitohemaglutinina bude 5  $\mu\text{g/ml}$  po bunariću. Kulture su zatim inkubirane 72 h na 37 °C i 5 %  $\text{CO}_2$ . Nakon

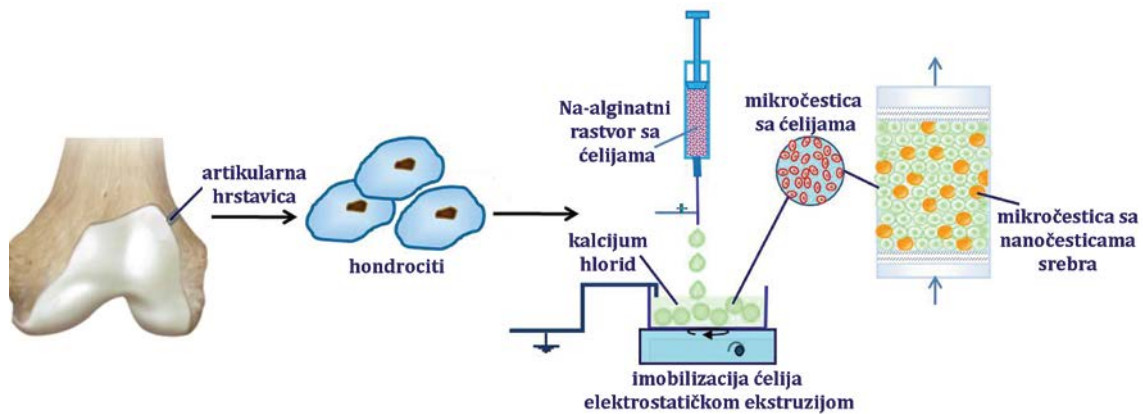
inkubacije od 72 h, u svaki bunarić je dodato po 10  $\mu$ l MTT reagensa. Uzorci su inkubirani naredna 4 h na 37 °C, a zatim je dodato po 100  $\mu$ l SDS (10 %) u svaki bunarić. Nakon prekonoćne inkubacije, očitavane su apsorbance na talasnoj dužini od 570 nm pomoću čitača *Multiskan EX Thermo Labsystems* (*Thermascientific, Waltham, MA, SAD*).

#### 3.10.4 ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI U MONOSLOJU HONDROCITA

Citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra je ispitivana na hondrocitima u monosloju (slika 3.5B) korišćenjem MTT testa (*Mosmann, 1983*). Kultura hondrocita je takođe gajena sa čistim Ca-alginatnim mikročesticama bez nanočestica srebra kako bi se proverila biokompatibilnost alginata, dok je monosloj kulture hondrocita služio kao kontrola. Dve eksperimentalne serije su izvedene: i) 0,3 g Ag/alginatnih mikročestica po bunariću (koncentracije nanočestica srebra:  $0,33 \pm 0,02$  mM,  $0,99 \pm 0,07$  mM i  $3,75 \pm 0,04$  mM) i ii) 0,6 g Ag/alginatnih mikročestica po bunariću (koncentracije nanočestica srebra:  $0,87 \pm 0,05$  mM,  $1,82 \pm 0,05$  mM, i  $3,76 \pm 0,02$  mM). Čelije su zasejene u ploče sa 12-bunarića u koncentraciji od  $1 \times 10^6$  ćelija u 3 ml medijuma za gajenje po bunariću i inkubirane 24 h na 37 °C sa 5 % CO<sub>2</sub> kako bi se zalepile za podlogu. Nakon toga je u svaku bunarić dodato po 0,3/0,6 g Ag/alginatnih, odnosno Ca-alginatnih mikročestica i zatim su kulture inkubirane 48 h na 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Posle 48 h u svaki bunarić je dodat MTT reagens (5 mg/ml, 0,3 ml) i uzorci su inkubirani još 3 h na 37 °C. Nakon inkubacije, medijum sa MTT reagensom je uklonjen, a u svaki bunarić je dodat zakišeljani izopropanol (0,1 M HCl u izopropanolu, 3 ml) kako bi se rastvorio formazan. Posle 15 min na sobnoj temperature, merena je apsorbance na talasnoj dužini od 540 nm pomoću UV-3100 spektrofotometra (*UV-3100, Mapada, Shaingai*).

### 3.10.5 ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI U 3D ĆELIJSKOJ KULTURI U PERFUZIONOM BIOREAKTORU

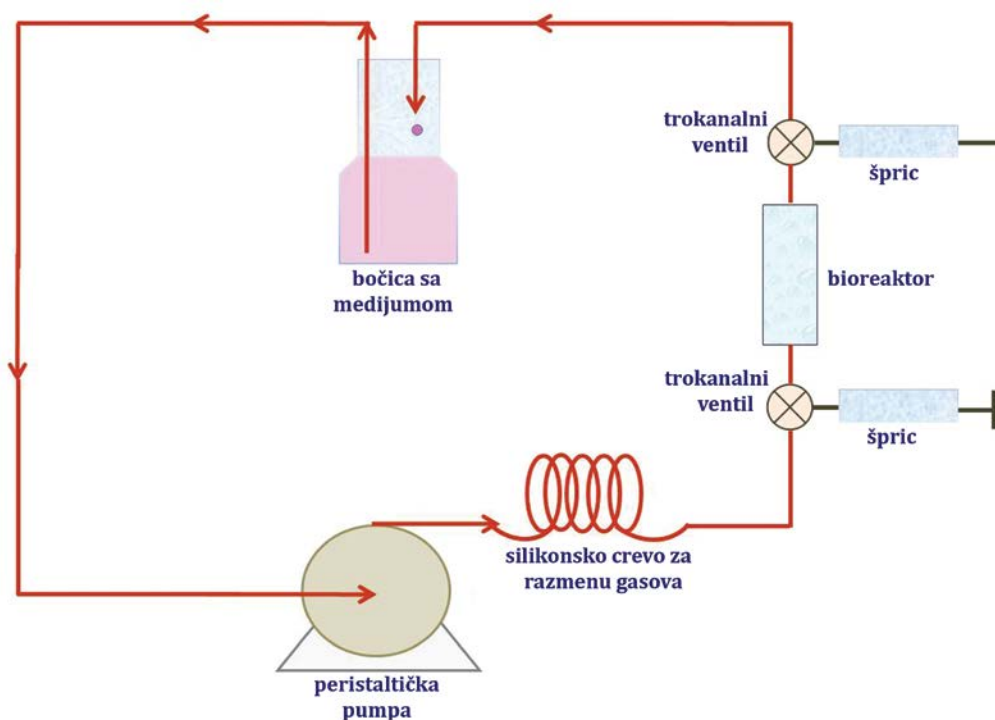
Za ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica pod uslovima koji imitiraju fiziološku sredinu imobilisani hondrociti unutar alginatnih mikročestica su gajeni u perfuzionom bioreaktoru zajedno sa Ag/alginatnim mikročesticama (slika 3.6).



**Slika 3.6.** Šematski prikaz izolacije hondrocita i studije citotoksičnosti u 3D bioreaktorskom gajenju: hondrociti su imobilisani u alginate mikročestice elektrostatičkom ekstruzijom i gajeni u perfuzionom bioreaktoru u prisustvu Ag/alginatnih mikročestica

Hondrociti, dobijeni iz hrskavice junadi starih 12 meseci, su imobilisani u alginate mikročestice putem elektrostatičke ekstruzije postupkom koji je opisan u odeljku 3.6. Rastvor 2,2 mas.% Na-alginata je sterilisan ključanjem uz mešanje na magnetnoj mešalici u toku 30 min. Hondrociti su pomešani sa ohladnim rastvorom tako da je dobijena koncentracija alginata od 1,5 mas.% i koncentracija hondrocita od  $21 \times 10^6$  ćelija/ml suspenzije. Suspenzija je zatim istiskivana kroz naelektrisanu iglu (23 G), pri elektrostatičkom naponu od 6,3 kV i rastojanju od vrha igle do rastvora za geliranje (1,5 mas.%  $\text{CaCl}_2$ ) od 3 cm. Dobijene alginate mikročestice sa imobilisanim hondrocitama su ostavljene 30 min u rastvoru za geliranje, a zatim su prebačene u medijum za gajenje u perfuzionom bioreaktoru.

U ovom radu je korišćen perfuzioni bioreaktor, dizajniran za tkivno inženjerstvo hrskavice i kosti (Osmokrović i sar., 2006), koji se sastojao od dva staklena dela spojena silikonskim crevom tako da je obrazovana komora za smeštanje pakovanog sloja mikročestica. Stakleni delovi na svojim krajevima imaju stopljene pločice od sinterovanog stakla, koje onemogućavaju odnošenja pakovanog sloja. Zapremina komore za gajenje staklenog bioreaktora je bila 1 ml. Svaka komora za gajenje ima sopstveni sistem za recirkulaciju medijuma, koji se sastoji od silikonskih creva (platinski isprana, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, SAD), i rezervoara za medijum (slika 3.7). Radi ekvibracije temperature i sadržaja CO<sub>2</sub> u medijumu, namotaj od 1 m silikonskog creva ispred svake komore je služio kao razmenjivač gasova. Pored toga, svaki sistem za recirkulaciju sadržao je po 1 špric ispred i iza bioreaktorske komore za zamenu medijuma i istiskivanje mehurića gasa.



**Slika 3.7.** Šematski prikaz eksperimentalnog bioreaktorskog sistema. Medijum se transportuje iz rezervoara za medijum u duži namotaj creva, koji služi za razmenu gasova, pomoću višekanalne peristaltičke pumpe, a zatim u komoru za gajenje i vraća u rezervoar. Špricevi ispred i iza komore služe za izvlačenje mehurića gasa iz medijuma, kao i za izmenu medijuma

Citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica je ispitana u gajenju zajedno sa alginatnim mikročesticama sa imobilisanim hondroцитima u dva bioreaktorske komore za gajenje sa svojim recirkulacionim sistemima. U svaku komoru je uneto 0,37 g alginatnih mikročestica sa imobilisanim ćelijama ( $21 \times 10^6$  ćelija/ml, 1,5 mas.% alginata, prečnik  $770 \pm 30 \mu\text{m}$ ) i 0,13 g Ag/alginatnih mikročestica (1,9 mas.% alginata, prečnik  $790 \pm 20 \mu\text{m}$ , koncentracija nanočestica srebra  $4,7 \pm 0,6 \text{ mM}$ ). Ukupna zapremina medijuma za gajenje u svakom sistemu sa recirkulacijom je bila 10 ml. Pomoću višekanalne peristaltičke pumpe je ostvarena kontinualna recirkulacija medijuma protokom od 0,38 ml/min. Tokom 2 nedelje gajenja, 40 % medijuma je menjano dva puta nedeljno. Po završetku gajenja izmerena je masa mikročestica i određena je koncentracija i vijabilnost imobilisanih ćelija nakon rastvaranja alginatnog hidrogela.

### 3.11 ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

Antimikrobna aktivnost vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica je ispitivana prema jednom odabranom soju Gram-pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus* TL i jednom soju Gram-negativnih bakterija *Escherichia coli* ATCC 25922.

Bakterijski sojevi su aktivirani tokom dva uzastopna presejavanja prekultura u *Luria-Bertani* (LB) medijumu (1 mas.% NaCl, 1 mas.% tripton i 0,5 mas.% ekstrakt kvasca) i inkubirani na 37 °C tokom noći u aerobnim uslovima. Prekonoćne kulture, ne starije od 18 h, su razblažene fiziološkim rastvorom tako da finalna koncentracija bakterija u rastvoru bude  $\sim 10^8$  CFU/ml (*colony-forming unit*).

Ag/alginatne mikročestice su sterilno dobijene i deo mikročestica je ostavljen da se suši u laminarnoj komori na sobnoj temperature do konstantne mase. Mikročestice korišćene za ispitivanje antimikrobne aktivnosti prema *S. aureus* TL u suspenziji su bile prečnika  $390 \pm 20 \mu\text{m}$  sa koncentracijom nanočestica srebra od  $1,2 \pm 0,05 \text{ mM}$ , dok su mikročestice korišćene za *E. coli* ATCC

25922 u suspenziji bile prečnika  $480 \pm 20 \mu\text{m}$  i imale su koncentraciju nanočestica srebra od  $1,7 \pm 0,2 \text{ mM}$ .

U svaki balon od 50 ml za ispitivanje antimikrobne aktivnosti Ag/alginatnih mikročestica je stavljeno 4 g (sa tačnošću od 1 mg) vlažnih, odnosno  $180 \pm 8 \text{ mg}$  suvih Ag/alginatnih mikročestica (prečnik  $\sim 200 \mu\text{m}$ ) što je odgovaralo vlažnoj masi mikročestica od 4 g. U balone je zatim dodato 10 ml sterilnog LB medijuma i 0,1 ml alikvota prekulture bakterijske suspenzije u fiziološkom rastvoru tako da je koncentracija bakterija u svakom balonu iznosila oko  $10^5\text{-}10^6 \text{ CFU/ml}$ . Bakterijske kulture u LB medijumu su korišćene kao kontrole. Baloni su inkubirani u vodenom kupatilu sa tresilicom na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  u toku 24 h. Nakon 1 h i 24 h inkubacije, medijum je sterilno uzorkovan (0,1 ml) iz svakog balona i serijski je razblaživan do željene koncentracije, a zatim je pomešan sa 20 ml rastopljene agaroze (temperatura  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i razliven u Petrijeve šolje. Šolje su zatim inkubirane 24 h na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  nakon čega su kolonije prebrojane na agaroznim pločama korišćenjem brojača kolonija kako bi se odredio broj živih ćelija u suspenziji.

Eksperimenti su rađeni u duplikatima i rezultati su izraženi u CFU/ml što predstavlja broj kolonija po ml.

### 3.12. ISPITIVANJE OTPUŠTANJA SREBRA IZ Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA

Da bi se rezultati ispitivanja funkcionalnosti Ag/alginatnih mikročestica kvantifikovali, izvedeno je nekoliko eksperimentalnih serija određivanja otpuštenog srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u uslovima koji su imitirali ispitivanja funkcionalnosti. Tako su izvedene 2 serije ispitivanja otpuštanja srebra u statičkim uslovima, jedan eksperiment otpuštanja srebra uz mešanje u vodenom kupatilu i jedan eksperiment u perfuzionom bioreaktoru sa recirkulacijom. U svim eksperimentima umesto medijuma korišćen je fiziološki rastvor (0,9 mas.% NaCl). Nakon ispitivanog perioda uzeti su uzorci iz svih eksperimentalnih serija i određene su koncentracije srebra atomskom apsorpcionom spektroskopijom (AAS) kako je opisano u odeljku 3.14.3.



### 3.12.1 ISPITIVANJE OTPUŠTANJA SREBRA IZ Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA U STATIČKIM USLOVIMA

Ag/alginate mikročestice sa različitim koncentracijama nanočestica srebra su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom kao što je opisano u odeljku 3.6. Dve eksperimentalne serije ispitivanja otpuštanja srebra u statičkim uslovima su izvedene: i) 0,3 g Ag/alginate mikročestica po bunariću (koncentracije nanočestica srebra:  $0,33 \pm 0,02$  mM,  $0,99 \pm 0,07$  mM i  $3,75 \pm 0,04$  mM) i ii) 0,6 g Ag/alginate mikročestica po bunariću (koncentracije nanočestica srebra:  $0,87 \pm 0,05$  mM,  $1,82 \pm 0,05$  mM, i  $3,76 \pm 0,02$  mM). U svaki bunarić je zatim dodato po 3 ml fiziološkog rastvora i zatim su uzorci inkubirani 48 h na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $5\%$   $\text{CO}_2$ . Nakon 48 h određene su koncentracije srebra u rastvoru i u Ag/alginate mikročesticama atomskom apsorpcionom spektroskopijom kako je opisano u odeljku 3.14.3. Eksperiment je rađen u triplikatu.

### 3.12.2 ISPITIVANJE OTPUŠTANJA SREBRA IZ Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA UZ MEŠANJE U VODENOM KUPATILU

Ag/alginate mikročestice su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom kako je opisano u odeljku 3.6 i deo mikročestica je ostavljen da se suši u laminarnoj komori na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Vlažne mikročestice su bile prečnik  $810 \pm 70\text{ }\mu\text{m}$  sa koncentracijom nanočestica srebra od  $1,93 \pm 0,05$  mM, dok su suve mikročestice bile prečnika  $440 \pm 80\text{ }\mu\text{m}$  i imale su koncentraciju nanočestica srebra od  $1,7 \pm 0,16$  mM po masi vlažnog hidrogela.

U svaki balon od 50 ml je stavljeno 4 g (sa tačnošću od 1 mg) vlažnih, odnosno  $148 \pm 2$  mg suvih Ag/alginate mikročestica što je odgovaralo vlažnoj masi mikročestica od 4 g. U balone je zatim dodato po 10 ml fiziološkog rastvora ( $0,9\text{ mas.}\%$  NaCl) i uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu sa tresilicom na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  u toku 24 h. Nakon 1 h, odnosno 24 h određene su koncentracije srebra u rastvoru i u Ag/alginate mikročesticama atomskom apsorpcionom spektroskopijom kako je opisano u odeljku 3.14.3. Eksperiment je izvođen u triplikatu i ponovljen dva puta.

### 3.12.3 ISPITIVANJE OTPUŠTANJA SREBRA IZ Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA U PERFUZIONOM BIOREAKTORU SA RECIRKULACIJOM

Kontrolne alginatne mikročestice bez ćelija dobijene su procedurom opisanom u odeljku 3.6. Ukratko, rastvor 1,5 mas.% alginata je potiskivan kroz vrh pozitivno naelektrisane igle (23 G) pri naponu od 6,3 kV i rastojanju između elektroda od 3 cm, dok je rastvor za geliranje bio kalcijum-hlorid dihidrat.

Dve bioreaktorske komore su napunjene kontrolnim mikročesticama (0,37 g, prečnik  $650 \pm 40 \mu\text{m}$ ) i Ag/alginatnim mikročesticama (0,13 g, prečnik  $500 \mu\text{m}$ , koncentracija nanočestica srebra  $5,5 \pm 0,4 \text{ mM}$ ). Svaka komora je povezana sa posebnim sistemom za recirkulaciju i napunjena sa 10 ml fiziološkog rastvora. Bioreaktorski sistemi su smešteni u inkubator sa 5 %  $\text{CO}_2$  i na temperaturi od  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  uz konstantnu recirkulaciju rastvora protokom  $0,3 \text{ ml/min}$  pomoću višekanalne peristaltičke pumpe. Eksperiment je trajao 3 dana što je odgovaralo prvoj zameni medijuma za gajenje u ispitivanjima citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica u istom sistemu. Nakon tri dana po završetku eksperimenta određene su koncentracije srebra u rastvoru i u Ag/alginatnim mikročesticama atomskom apsorpcionom spektroskopijom kako je opisano u odeljku 3.14.3. Eksperiment je ponovljen 3 puta.

### 3.13 *IN VIVO* STUDIJE EFIKASNOSTI Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITA

U cilju provere funkcionalnosti različitih formulacija na bazi alginata i nanočestica srebra ispitivana je efikasnost odabranih nanokompozitnih biomaterijala za zarastanje rana na modelu opekotina II stepena kod miševa i pacova i na modelu nekroze kod pacova.

#### 3.13.1 MODEL OPEKOTINA NA PACOVIMA

Mušjaci *Wistar* pacova, stari 8–12 nedelja, mase 180–220 g, su korišćeni za ispitivanje efikasnosti nanokompozitnih Ag/alginatnih rastvora i mikrovlakana u lečenju rana, na modelu opekotina II stepena. Sve životinje su bile smeštene u polipropilenskim kavezima, u prostoriji sa ciklusima svetlo:tama 12:12 h, na

sobnoj temperaturi od  $22 \pm 1$  °C, vlažnošću vazduha od 50 % i hranjene standardnom laboratorijskom hranom za pacove (*Vetprom, Beograd, Srbija*). Hrana i voda za piće su davani *ad libitum*. Eksperimentalni protokol je odobren od strane Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (323-07-5285/2013-05/1).

Termičke opekotine su standardizovane kao što je navedeno u literaturi (*dos Santos Tavares Pereira i sar., 2012*) u cilju dobijanja dubokih opekotina drugog stepena uvek iste veličine. Ukratko, sve životinje su anestezirane pomoću 10 % ketamina (0,8 ml/kg). Nakon pažljivog uklanjanja krzna sa leđa, depilacijom pomoću kreme, životinje su izložene termičkim povredama, nanesenim korišćenjem čvrste aluminijske šipke (prečnik 10 mm) zagrejane u ključaloj vodi na temperaturi od 100 °C. Šipka je držana u kontaktu sa kožom životinja na srednjem delu leđa tokom 15 s. Pritisak na koži je odgovarao masi od 50 g aluminijske šipke. Životinje su preko vode dobijale odgovarajući analgetik prva dva dana. Svakodnevno su praćene promene na opekotinama merenjem prečnika rane (najveći i najmanji prečnik), i veličine kruste, kao i praćenjem pojave edema i eritema. Takođe, vođena je foto dokumentacija.

U određenim slučajevima uzeti su brisevi iz rana za mikrobiološku analizu, a nakon žrtvovanja životinja uzeti su uzorci tkiva rane za histopatološku analizu.

Izvedene su dve eksperimentalne studije ispitivanja efikasnosti Ag/alginatnih koloidnih rastvora i Ag/alginatnih mikrovlakana.

### 3.13.2 ISPITIVANJE EFIKASNOSTI Ag/ALGINATNOG KOLOIDNOG RASTVORA NA MODELU OPEKOTINA II STEPENA KOD PACOVA

Ag/alginatni koloidni rastvori su elektrohemijski sintetisani u 3 eksperimentalne serije. Svaka serija je sintetisana neposredno pre tretmana kako je opisano u odeljku 3.2. Nakon stabilizacije od 3 dana elektrohemijski sintetisani Ag/alginatni koloidni rastvori su razblaženi 1,73 mas.% rastvorom Na-alginate do koncentracije nanočestica srebra od 1 mM i dodata je askorbinska kiselina do

finalne koncentracije askorbinske kiseline od 0,1 mg/ml. Sveži koloidi su korišćeni 1., 5. i 15. dan tretmana.

Pacovi su nasumičnim izborom bili podeljeni u 3 grupe: i) kontrolna grupa, koja je bila opečena, i netretirana (G1), ii) grupa tretirana komercijalnom kremom „Sanaderm®” (G2), iii) grupa tretirana sa 1 mM Ag/alginatnim koloidnim rastvorom sa askorbinskom kiselinom (G3), i iv) zdrava kontrolna grupa koja je bila neopečena, a tretirana (G4). Grupe G1, G2 i G3 su sadržale po 9 životinja, dok je G4 sadržala 2 životinje. Sve rane su svakodnevno ispirane fiziološkim rastvorom (0,9 mas.% NaCl), a potom su rane u grupi G2 tretirane sa  $155 \pm 21$  mg komercijalne kreme, a u grupama G3 i G4 sa po 120  $\mu$ l Ag/alginatnog koloidnog rastvora.

Životinje iz tretiranih grupa (G2 i G3) su žrtvovane nakon 4, 11 i 21 dana od indukcije opekotine. Životinje iz kontrolne grupe (G1) su žrtvovane 4-og, 11-og, 21-og i 25-og dana kada je rana u potpunosti zarasla, dok su iz zdrave kontrole G4 žrtvovane 21-og dana. Žrtvovanje je izvršeno povećanjem koncentracije CO<sub>2</sub> u komori specijalno dizajniranoj za ovu svrhu.

### 3.13.3 ISPITIVANJE EFIKASNOSTI Ag/ALGINATNIH MIKROVLAKANA NA MODELU OPEKOTINA II STEPENA KOD PACOVA

Ag/alginatna mikrovlakna su dobijena na način opisan u odeljku 3.7, pri čemu je korišćen rastvor alginata srednjeg viskoziteta za sintezu nanočestica srebra koji je zatim razblažen rastvorom 1,73 mas.% Na-alginata niskog viskoziteta do nominalne koncentracije nanočestica srebra od 1,4 mM. Jedan deo mikrovlakana je zatim sušen. Na poleđini sterilnih plastičnih Petrijevih šolja nacrtani krugovi prečnika oko 8,5 mm u koje je stavljeno po  $203 \pm 12$  mg vlažnih mikrovlakana raširenih da pokriju celu površinu kruga. Mikrovlakna su zatim ostavljena da se suše u laminarnoj komori sve dok njihova masa nije postala konstantna.

Pacovi su nasumičnim izborom bili podeljeni u 4 grupe: i) kontrolna grupa, koja je bila opečena, i netretirana (G1), ii) grupa tretirana komercijalnom oblogom „Suprasorb®A+Ag” (G2), iii) grupa tretirana vlažnim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) i iv) grupa tretirana suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G4). Svaka grupa je sadržala po 9 životinja. Rane su svakodnevno ispirane fiziološkim rastvorom (0,9 mas.% NaCl), a potom su tretirane u grupi G2 sa  $24 \pm 2$  mg komercijalne obloge, u grupi G3 sa  $216 \pm 14$  mg vlažnih Ag/alginatnih mikrovlakana i u grupi G4 sa  $9 \pm 1$  mg suvih Ag/alginatnih mikrovlakana (što je odgovaralo masi vlažnih mikrovlakana od  $203 \pm 12$  mg). Pre stavljanja suvih Ag/alginatnih mikrovlakana na ranu, mikrovlakna su uronjena u fiziološki rastvor kako bi bolje prijanjala na ranu.

Životinje su žrtvovane nakon 4, 11 i 19 dana od indukcije termičke opekotine povećanjem koncentracije CO<sub>2</sub>, u komori specijalno dizajniranoj za ovu svrhu.

#### 3.13.4 MODEL OPEKOTINA NA MIŠEVIMA

Mušjaci miševa (*Mus musculus*), stari 20 nedelja, mase 27-33 g, su korišćeni za studije efikasnosti nanokompozitnih Ag/alginatnih suvih mikrovlakana sa medom u lečenju rana, na modelu opekotina II stepena.

Sve životinje su bile smeštene u polipropilenskim kavezima, u prostoriji sa ciklusima svetlo:tama 12:12 h, na sobnoj temperaturi od  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , vlažnošću od 50 % i hranjene standardnom laboratorijskom hranom za miševе. Hrana i voda za piće su davani *ad libitum*. Eksperimentalni protokol je odobren od strane Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (323-07-5285/2013-05/1).

Sve životinje su uvedene u totalnu anesteziju, intraperitonealnom aplikacijom 10 % rastvorom ketamina (40 mg/kg). Dan pre eksperimenta krzno sa leđa životinje je uklonjeno pažljivim brijanjem. Nakon toga životinje su izložene termičkim povredama. Povrede su napravljene korišćenjem čvrste alumini jumske

šipke kvadratnog poprečnog preseka (dimenzija 5 x 5 mm) zagrejane u ključaloj vodi na temperaturi od 100 °C. Šipka je držana u kontaktu sa kožom životinja na srednjem delu leđa tokom 10 sekundi. Pritisak na koži je odgovarao masi od 50 g aluminijumske šipke. Nakon izazivanja opekotine životinje su provučene kroz hladnu vodu kako bi se sprečilo dalje oštećenje tkiva. Na ovaj način su izazvane opekotine drugog stepena. Životinje su preko vode dobijale odgovarajući analgetik prva dva dana. Svakodnevno su praćene promene na opekotinama, mereni su prečnik rane (najveći i najmanji prečnik), i veličina kruste, a praćena je pojava edema i eritema. Takođe, vođena je fotodokumentacija.

### 3.13.5 ISPITIVANJE EFIKASNOSTI Ag/ALGINATNIH MIKROVLAKANA SA MEDOM NA MODELU OPEKOTINA II STEPENA KOD MIŠEVA

Elektrohemijski sintetisani 3,9 mM Ag/alginatni koloidni rastvor niskog viskoziteta je razblažen 5,97 mas.% alginatom (niskog viskoziteta) i medom tako da finalna koncentracija alginata bude 2 mas.%, meda 50 mas.% i nanočestica srebra 0,9 mM. Smeša je mešana pomoću stubne mešalice „UltraTurrax” (IKA® T25 digital, Ultra-Turrax, Nemačka) na brzini od 15800 obrtaja/min. Mikrovlakna su dobijena ekstruzionom tehnikom bez istezanja koja je opisana u odeljku 3.7, a zatim sušena. Ukratko, na poleđini sterilnih plastičnih Petrijevih šolja nacrtani su kvadrati (dimenzija 5 x 5 mm), u koji je stavljeno po  $72 \pm 7,1$  mg vlažnih mikrovlakana. Mikrovlakna su ostavljena da se suše u laminarnoj komori do konstantne mase.

Životinje su nasumičnim izborom bile podeljene u 3 grupe: i) kontrolna grupa, koja je bila opečena, i netretirana (G1), ii) grupa tretirana komercijalnom oblogom „Vivamelom®” (G2) i iii) grupa, tretirana suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3). U prvoj kontrolnoj grupi je bilo 8 životinja, a u ostale dve grupe po 6. Rane su svakodnevno ispirane fiziološkim rastvorom (0,9 mas.% NaCl), a zatim u grupi G2 tretirane sa  $84 \pm 7$  mg komercijalne obloge, a u grupi G3 sa  $6,2 \pm 1,1$  mg suvih Ag/alginatnih mikrovlakni sa medom.

Životinje su žrtvovane 10-og i 21-og dana (kada je rana potpuno zarasla kod životinja iz grupe tretirane Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom, G3) u opštoj anesteziji cervikalnom dislokacijom. Takođe, 25-og dana su žrtvovane preostale 2 životinje iz kontrolne grupe (G1) kada je rana u ovoj grupi potpuno zarasla.

### 3.13.6 MODEL NEKROZE NA PACOVIMA

Mušjaci *Wistar* pacova, stari 8–12 nedelja, mase 180–220 g, su korišćeni za studije efikasnosti nanokompozitnih Ag/alginatnih mikrovlakana i Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom u lečenju rana, na modelu nekroza kod pacova. Sve životinje su bile smeštene u polipropilenskim kavezima, u prostoriji sa ciklusima svetlo:tama 12:12 h, na sobnoj temperaturi od  $22 \pm 1$  °C, vlažnošću od 50 % i hranjene standardnom laboratorijskom hranom za pacove (*Vetprom, Beograd, Srbija*). Hrana i voda za piće su davani *ad libitum*. Eksperimentalni protokol je odobren od strane Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (323-07-00644/2014/05).

Nekrotične rane su indukovane prema proceduri iz literature (*Kesik i sar., 2010*). Ukratko, sve životinje su anestezirane pomoću 10 % rastvora ketamina (0,8 ml/kg). Nakon pažljivog uklanjanja krzna sa leđa, depilacionom kremom, životinjama je indukovana nekroza intradermalnim ubrizgavanjem 200 µl doksorubicina koncentracije 5 mg/ml, rastvorenog u fiziološkom rastvoru. Lezija je dostigla maksimalnu veličinu nakon 14 dana od indukcije, što odgovara podacima iz literature (*Kesik i sar., 2010*). Tretman rana je počeo nakon 14 dana od indukcije nekroze i trajao je 28 dana, svakodnevno u 9 h ujutru. Svakodnevno su praćene promene na rani: meren je prečnik rane i prisustvo kruste. Oblika rane je bio bliži elipsi nego kružnici, pa je meren prečnik u smeru glava–rep i prečnik u smeru leva lopatica–desna lopatica, što je omogućilo izračunavanje površine rane. Takođe, su u eksperimentalnoj studiji ispitivanje efikasnosti Ag/alginatnih mikrovlakana usled pojave infekcije 18-og i 28-og dana uzeti brisevi rana životinja iz kontrolne grupe (G1) i grupe tretirane komercijalnom oblogom (G2), redom za mikrobiološku analizu. Žrtvovanja životinja su obavljena nakon 28 i 42 dana od

indukovanja nekroze. Žrtvovanje je vršeno rastućom koncentracijom CO<sub>2</sub> u komori posebno dizajniranoj za tu namenu. Rađene su dve eksperimentalne studije.

### 3.13.7 ISPITIVANJE EFIKASNOSTI Ag/ALGINATNIH MIKROVLAKANA NA MODELU NEKROZE KOD PACOVA

Elektrohemijski sintetisan 3,9 mM Ag/alginatni koloidni rastvor niskog viskoziteta je razblažen 2,1 mas.% rastvorom Na-alginata niskog viskoziteta tako da finalna koncentracija nanočestica srebra u koloidnom rastvoru bude 0,71 mM i alginata 2 mas.%. Mikrovlakna su dobijena ekstruzionom tehnikom uz istežanje kako je opisano u odeljku 3.7, a zatim sušena. Ukratko, na poledini sterilnih plastičnih Petrijevih šolja nacrtani su krugovi (prečnik 10 mm) u koje je stavljeno po 203,5 ± 11,4 mg vlažnih mikrovlakana su razvučenih tako da pokriju celu površinu kruga. Mikrovlakna su ostavljena da se suše u laminarnoj komori do konstantne mase.

Životinje su nasumično podeljene u 3 grupe: i) kontrolna grupa, u kojoj su indukovane nekrotične rane, ali netretirane (G1), ii) grupa tretirana komercijalnom oblogom „Suprasorb®A+Ag” (G2), i iii) grupa tretirana suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3). U svim grupama je bilo po 6 životinja. Rane su svakodnevno ispirane fiziološkim rastvorom (0,9 mas.% NaCl) i u grupi G2 su tretirane sa 17,6 ± 2,6 mg komercijalne obloge, a u grupi G3 sa 11,1 ± 1,0 mg suvih Ag/alginatnih mikrovlakana. Pre stavljanja suvih Ag/alginatnih mikrovlakana na ranu, mikrovlakna su uronjena u fiziološki rastvor kako bi bolje prianjala na ranu.

### 3.13.8 ISPITIVANJE EFIKASNOSTI Ag/ALGINATNIH MIKROVLAKANA SA MEDOM NA MODELU NEKROZE KOD PACOVA

Elektrohemijski sintetisan 3,9 mM Ag/alginatni koloidni rastvor niskog viskoziteta je razblažen 6,0 mas.% rastvorom alginata niskog viskoziteta i medom tako da finalna koncentracija alginata bude 2 mas.%, meda 50 mas.% i nanočestica srebra 0,9 mM. Smeša je mešana pomoću stubne mešalice „UltraTurrax” (IKA® T25 digital, Ultra-Turrax, Nemačka) na brzini od 15800 obrtaja/min. Mikrovlakna



sa medom su dobijena ekstruzionom tehnikom uz istezanje kako je opisano u odeljku 3.7, a zatim su sušena. Ukratko, na poleđini sterilne plastične Petrijeve šolje nacrtani su krugovi (prečnik 10 mm) u koje je stavljeno po  $206 \pm 11$  mg vlažnih mikrovlakana. Mikrovlakna su ostavljena da se suše u laminarnoj komori do konstantne mase.

Životinje su podeljene u 3 grupe: i) kontrolna, netretirana grupa, u kojoj su indukovane nekrotične rane (G1), ii) grupa tretirana komercijalnom oblogom „Vivamel®” (G2), i iii) grupa tretirana suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3). U svim grupama je bilo po 6 životinja. Rane su svakodnevno ispirane fiziološkim rastvorom (0,9 mas.% NaCl), a zatim su u grupi G2 tretirane sa  $206 \pm 25$  mg komercijalne obloge i u grupi G3 sa  $20 \pm 3$  mg suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom. Pre stavljanja suvih Ag/alginatnih mikrovlakana na ranu, mikrovlakna su uronjena u fiziološki rastvor kako bi bolje prijanjala na ranu.

#### 3.13.9 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

Brisevi uzeti sa inficiranih rana su zasejani u hranljivi bujon sastava 15 g/l peptona 3 g/l mesnog ekstrakta, 5 g/l natrijum-hlorida, 0,3 g/l kalijum-hidrogenfosfat i u BH (*brain heart brot*) infuzioni bujon sastava 5 g/l infuza goveđeg srca, 12,5 g/l infuza telećeg mozga, 2,5 g/l dinatrijum hidrogen fosfata, 2 g/l D-glukoze i 10 g/l peptona. Nakon inkubacije na  $35\text{ }^{\circ}\text{C}/24\text{ h}$  iz tečne kulture su napravljeni mikrobiološki preparati i obojeni po Gramu. Metoda bojenja po Gramu je empirijska metoda razlikovanja bakterija u dve grupe (Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije). Mikrobiološki preparati su prvo bojeni kristalviolet bojom (3-5 min), koja boji sve bakterije u ljubičasto, a zatim je dodat lugol koji fiksira boju unutar bakterijskog zida. Sve bakterije nakon dodavanja lugola ostaju obojene ljubičasto. Obojeni preparati su ispirani alkoholom (96 %), kako bi se utvrdilo za koje bakterije se vezala boja. Kristalviolet se ne može isprati iz zidova bakterija sa gustom mrežom peptidoglikana što je slučaj kod Gram-pozitivnih bakterije, dok se iz zidova bakterija sa tankim slojem peptidoglikana ova boja ispira i one postaju bezbojne što ukazuje na Gram-negativne bakterije. Na

kraju postupka bojenja po Gramu dodaje se boja safranin koja Gram-negativne bakterije boji u ružičastu ili crvenu boju.

Tečne kulture su takođe presejane na: i) Miler Hinton (*Mueller-Hinton*) agar (17 g/l agara, 2 g/l goveđeg infuza, 1,5 g/l skroba, 17,5 g/l kazein hidrolizaza), ii) Bird Parker (*Baird-Parker*) agar, selektivnu hranljivu podlogu za koagulaza pozitivan *Staphylococcus aureus* (15 g/l agara, 10 g/l kasein hidrolizata, 12 g/l glicina, 5 g/l litijum hlorida i 5 g/l mesnog ekstrakta), i iii) Mek Konki (*Mac Conkey*) agar, diferencijalnu podlogu za enterobakterije (12 g/l agara, 10 g/l laktoze, 0,07 g/l neutralo crveno, 20 g/l peptona i 5 g/l natrijum-hlorida). Bakterijske kulture su inkubirane na 35 °C u periodu od 18 do 24 h, nakon čega su identifikovane bakterijske kulture.

### 3.13.10 HISTOLOŠKA ANALIZA

Uzorci tkiva kože su stavljeni u unapred pripremljen rastvor fiksativa, odnosno u 4 % neutralno puferisan formaldehid (10 % formalin) u toku najmanje 24 h. Potom je tkivo dehidratirano u rastvorima alkohola rastućih koncentracija (70 %, 96 % i 100 %), prosvetljivano u ksilolu i kalupljeno u Paraplastu aparatom za kalupljenje (*Sakura Tissue-Tek TEC, CA, SAD*).

Svaki kalup je potom pažljivo nivelisan i sečen do pojave cele debljine uzorka. Kalupi tkiva su serijski sečeni mikrotomom (*Leica Reinhart Austria i Leica SM 2000 R Germany*) na isečke debljine 5 µm. Tako dobijeni isečci bojeni su hematoksilin i eozin histohemijskom tehnikom (*Gamble i sar., 2007*), odnosno Mason trihrom metodom (*Jones i sar., 2007*). Uzorci tkiva opekotina kod miševa su bojeni i metodom za selektivno bojenje retikulinskih vlakana (*Jones i sar., 2007*).

Digitalne fotografije su analizirane pomoću programa *ImageJ* (*National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD*) tako da su određeni: maksimalni prečnik ulceracije (rane), širine zona pokrivene novostvorenim epitelom i granulacionim tkivom i debljina epiderma (*Schneider i sar., 2007*). Debljina epiderma je merena 5 puta u predelu nekrotične rane i 3–5 puta u neoštećenj

koži, kao distanca između bazalne membrane i granice između *stratum granulosum* i *stratum corneum*.

Praćena je i skorovana pojava: subepidermalnih neutrofila, edema, makrofaga, angiogeneze, prisustvo fibroblasta i reepitelizacije. Skorovanje je izvedeno prema podacima iz literature u opsegu 0-3 (*Turtay i sar., 2010*). Subepidermalni neutrofil, angiogeneza, edem, gustina fibroblasta i makrofaga su procenjavani prema procentu njihovih gustina na 40x uvećanoj zoni opekotine. Skorovanje pomenutih parametara se određivalo na sledeći način: 0 - između 0 i 10 %; 1 - između 10 i 40 %; 2 - između 40 i 70 % i 3 - između 70 i 100 %. Trajanje reepitelizacije je procenjivano na 40x uvećanim slikama preseka tkiva. Skorovanje je bilo 0 - kada nije bilo reepitelizacije, 1 - kada je reepitelizovalo do 1/3 opečene površine, 2 - kada je reepitelizovalo do 2/3 opečene površine, 3 - kada je reepitelizovalo više od 2/3 opečene površine.

#### 3.13.11 STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza je urađena u programu *SPSS Statistics za Windows 17.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, SAD)*. Sve vrednosti su izražene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Poređenje vrednosti između tretiranih grupa i kontrolne grupe je izvedeno uz pomoć jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) praćene Tukijevim testom zaista značajnih razlika (*Tukey's test*) i Man-Vitni (*Mann-Whitney*) U testom. Vrednost  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom.

### 3.14 METODE KARAKTERIZACIJE Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITA

#### 3.14.1 UV-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA

Prisustvo nanočestica srebra u koloidnom rastvoru, kao i u nanokompozitnim mikročesticama i mikrovlaknima nakon rastvaranja hidrogela je ispitano UV-vidljivom spektroskopijom, pomoću UV -vidljivog spektrofotometra (*UV3100, Mapada, Shanghai*). Pri tome su Ag/alginatni koloidni rastvori razblaženi destilovanom vodom i to 100  $\mu$ l koloidnog rastvora u 2,9 ml dH<sub>2</sub>O. Sa druge strane,

Ag/alginate mikročestice i mikrovlakna su rastvorena u 2 mas.% rastvoru natrijum-citrata dihidrata, i to 0,2 g vlažnih mikročestica/mikrovlakana u 5,8 ml rastvora, odnosno 0,01 g suvih mikročestica/mikrovlakana u 6 ml rastvora. Nakon rastvaranja mikročestica/mikrovlakana rađena je UV-vidljiva spektroskopija.

PVA/Ag/alginate čestice su takođe rastvarane u 2 mas.% rastvoru natrijum-citrata dihidrata i to tako što je 0,09 g čestica rastvarano u 3 ml rastvora tokom 1 h, a zatim su čestice prebačene u 3 ml svežeg rastvora i rastvarane još 24 h, nakon čega je prisustvo nanočestica ispitano UV-vidljivom spektroskopijom.

Uticaj Na-citrata na stabilnost nanočestica srebra je ispitan merenjem apsorbanca 3,9 mM Ag/alginate koloidnog rastvora pomešanog sa 2 mas.% rastvorom natrijum citrata dihidrata u odnosu 1:9 na talasnoj dužini od 405 nm svakih 10 min u toku 1 h.

### 3.14.2 TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Veličina i oblik nanočestica srebra u početno sintetisanom Ag/alginate koloidnom rastvoru ispitivani su pomoću transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) korišćenjem „100 CX Electron” mikroskopa (JEOL Ltd., Tokio, Japan), na radnom naponu od 100 kV. Uzorci za TEM analizu su postavljeni na bakarnim mrežama prekrivenim ugljenikom (SPI Supplies/Structure Probe Inc., West Chester, PA, SAD).

### 3.14.3 KONCENTRACIJA SREBRA U Ag/ALGINATNIM NANOKOMPOZITIMA

Koncentracija srebra u Ag/alginate mikročesticama i mikrovlaknima je utvrđena nakon oksidacije svih nanočestica dodavanjem koncentrovane azotne kiseline (65 mas.%) u višku (5-15 ml kiseline na 0,1 g mikročestica/mikrovlakana) ili posle rastvaranja mikročestica/mikrovlakana u 2 mas.% rastvoru Na-citrata (0,1 g vlažnih u 3 ml, odnosno 0,01 g suvih u 6 ml) i dodavanja amonijum hidroksida (25 mas.%) i to 5-10 ml amonijum hidroksida na 0,1 g vlažnog hidrogela. Koncentracije jona srebra u rastvorima su tada određene sa tačnošću

$10^{-3}$  atomskom apsorpcionom spektroskopijom (AAS) pomoću Perkin Elmer 3100 spektrometra (*Perkin Elmer, MA, SAD*).

Koncentracija slobodnih jona srebra u fiziološkom rastvoru je određena direktnim merenjem, dok je ukupni sadržaj oslobođenog srebra u fiziološkom rastvoru predstavljen kao  $\text{Ag}^+$  i  $\text{AgCl}$ , određen posle dodavanja amonijum hidroksida (25 mas.%) u višku (0,5 ml amonijum hidroksida na 1 ml medijuma) direktno u bunariće u kojima su eksperimenti izvođeni kako bi se rastvorio  $\text{AgCl}$ .

#### 3.14.4 OPTIČKA MIKROSKOPIJA

Prečnici mikročestica i mikrovlakana su određeni pomoću optičkog mikroskopa (*Olympus CX41RF, Tokio, Japan*). Srednji prečnik je izračunat na osnovu merenja najmanje 20 mikročestica, odnosno mikrovlakana pomoću programa za analizu slike „CellA” (*Olympus, Tokio, Japan*).

#### 3.14.5 FE-SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (FIELD-EMISSION SCANNING ELECTRON MICROSCOPY)

U ovom radu je razvijena i primenjena jednostavna metoda za vizuelizaciju nanočestica srebra unutar  $\text{Ag}$ /alginatnih mikročestica pomoću FE-skenirajuće elektronske mikroskopije (FE-SEM). Vlažne mikročestice su pomešane sa 1,73 mas.% alginatnim rastvorom i potom je dobijena suspenzija razlivena u Petrijevu šolju čije dno je pokriveno filter papirom koji je prethodno natopljen rastvorom za geliranje (3 mas.%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ). Nakon toga je suspenzija prekrivena još jednim natopljenim filter papirom preko koga je polako dodat rastvor za geliranje dok se Petrijeva šolja nije napunila. Posle 24 h na sobnoj temperaturi formira se alginatni gel, koja je zatim prebačena u posudu sa svežim rastvorom za geliranje narednih 24 h da bi se geliranje završilo. Iz dobijenog alginatnog hidrogela sa glatkim površinama su uz pomoć epruvete (unutrašnji prečnik 13 mm) isecani identični alginatni diskovi (prečnik 13 mm, debljina 3 mm), koji su sadržali  $\text{Ag}$ /alginatne mikročestice. Diskovi su zatim prebačeni u sveži rastvor za geliranje kako bi se omogućilo potpuno geliranje u toku 24 h.

Diskovi su nakon toga isprani destilovanom vodom i fiksirani 48 h u rastvoru 2,5 mas.% glutaraldehida. Nakon toga su alginatni diskovi sa Ag/alginatnim mikročesticama isprani u skladu sa modifikovanim protokolom fiksacije i bojenje za histološku analizu (*Stevens i sar., 2004*) sledećim vodenim rastvorima redom: i) rastvorom 3 % sirćetne kiseline; ii) rastvorom 3 % sirćetne kiseline i 25 % etanola; iii) rastvorom 3 % sirćetne kiseline i 50 % etanola; iv) rastvorom 70 % etanola. Diskovi su čuvani u 70 % rastvoru etanola na sobnoj temperaturi. Nakon toga su diskovi sečeni u tanke listiće koji su postavljeni na komadiće mikroskopskog stakla, gde su se sušili, a zatim koristili za FE-SEM analizu.

S druge strane, suve Ag/alginatne mikročestice su fiksirane procedurom za histološko bojenje koje je gore opisana, pomoću glutaraldehida nakon čega su isprane sledećim rastvorima redom: i) rastvorom 3 % sirćetne kiseline; ii) rastvorom 3 % sirćetne kiseline i 25 % etanola; iii) rastvorom 3 % sirćetne kiseline i 50 % etanola; iv) rastvorom 70 % etanola. Nakon toga su mikročestice pomešane sa 1,73 mas.% alginatnim rastvorom. Smeša je zatim razlivena u Petrijevu šolju, gde se sušila 48 h na sobnoj temperaturi pri čemu je dobijen film sa inkorporisanim suvim Ag/alginatnim mikročesticama. Filmovi su sečeni na tanke preseke i zatim analizirani pomoću FE-SEM metode.

FE-SEM analiza je rađena korišćenjem *MIRA 3 XMU Field Emission Scanning Electron Microscope* (Tescan USA Inc., Cranberry Twp, PA).

#### 3.14.6 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I VIJABILNOSTI IMOBILISANIH HONDROCITA

Koncentracija i vijabilnost imobilisanih hondrocita su određene nakon rastvaranja mikročestica u rastvoru 2 mas.% Na-citrata (oko 80 mg mikročestica u 1 ml rastvora Na-citrata). Koncentracija ćelija je određena brojanjem ćelija pod optičkim mikroskopom uz pomoć hemocitometra. Vijabilnost ćelija je određena na osnovu odnosa broja ćelija koje su ostale bezbojne i broja ćelija koje su se obojile bojom tripan plavo.

## 4. REZULTATI

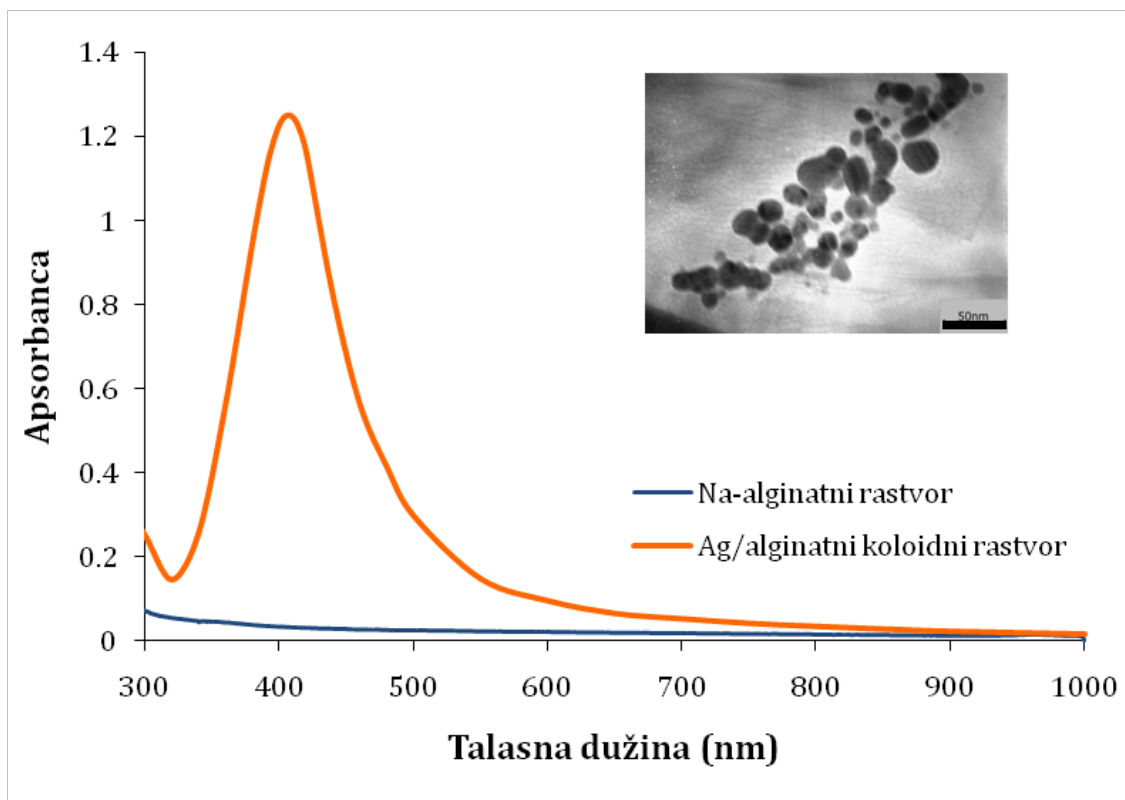
Istraživanja u ovom radu su obuhvatala razvoj novih nanokompozita na bazi alginata i nanočestica srebra počevši od optimizacije početno sintetisanog koloidnog rastvora, primene različitih tehnika za dobijanje nanokompozitnih hidrogelova u različitim oblicima kako u vlažnom tako i u suvom stanju do sveobuhvatne karakterizacije dobijenih nanokompozita u *in vitro*, a zatim i u *in vivo* uslovima u tretmanu rana na miševima i pacovima.

### 4.1 OPTIMIZACIJA Ag/ALGINATNOG KOLOIDNOG RASTVORA

U alginatnom rastvoru su sintetisane nanočestice srebra elektrohemijском sintezom.<sup>3</sup> Prisustvo nanočestica srebra je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom, kao i TEM analizom. UV-vidljivi spektar pokazuje da elektrohemijski sintetisane nanočestice srebra u alginatnom rastvoru, imaju maksimalnu apsorbciju na talasnoj dužini od oko 405 nm, koja odgovara nanočesticama srebra (slika 4.1). Analizom TEM mikrofotografije pokazano je da su elektrohemijski sintetisane nanočestice srebra sferične i prečnika oko 30 nm (slika 4.1, insert). Za razliku od Ag/alginatnih koloidnih rastvora, rastvor čistog 1,9 mas.% Na-alginata ne pokazuje apsorpcioni pik na relevantnim talasnim dužinama od 400 do 600 nm (slika 4.1).

---

<sup>3</sup> Obradović B., Mišković-Stanković V., Jovanović Ž., Stojkovića J., Dobijanje mikročestica hidrogela alginata sa inkorporisanim nanočesticama srebra, (Production of alginate microbeads with incorporated silver nanoparticles), patent br. RS53508 (B1), Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije, od 27.02.2015.

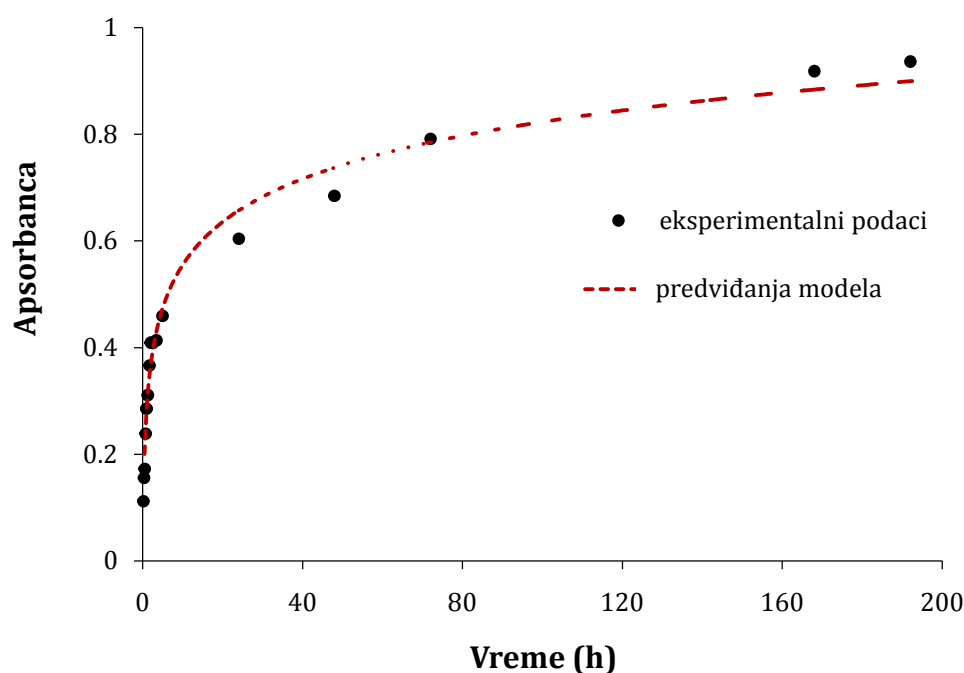


**Slika 4.1.** Apsorpcioni spektri elektrohemijski sintetisanog Ag/alginatnog koloidnog rastvora, sa koncentracijom nanočestica srebra i Na-alginata od 3,9 mM i 1,9 mas.%, redom, i 1,9 mas.% Na-alginata (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 15\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji); insert: TEM mikrofotografija elektrohemijski sintetisanih nanočestica srebra u Ag/alginatnom koloidnom rastvoru (razmernik: 50 nm)

#### 4.1.1 STABILNOST Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH RASTVORA

U cilju ispitivanja stabilnosti elektrohemijski dobijenih nanočestica srebra u alginatnom rastvoru, mereni su intenziteti apsorbance Ag/alginatnih koloidnih rastvora na talasnoj dužini od 405 nm u toku vremena. Dobijeni rezultati ukazuju da u prva tri dana od elektrohemijske sinteze dolazi do značajnog povećanja intenziteta apsorbance posle čega intenzitet postaje približno konstantan. Na slici 4.2 je prikazan intenzitet apsorbance u toku vremena na jednom od ispitivanih alginatnih koloidnih rastvora sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra koncentracije 3,9 mM.





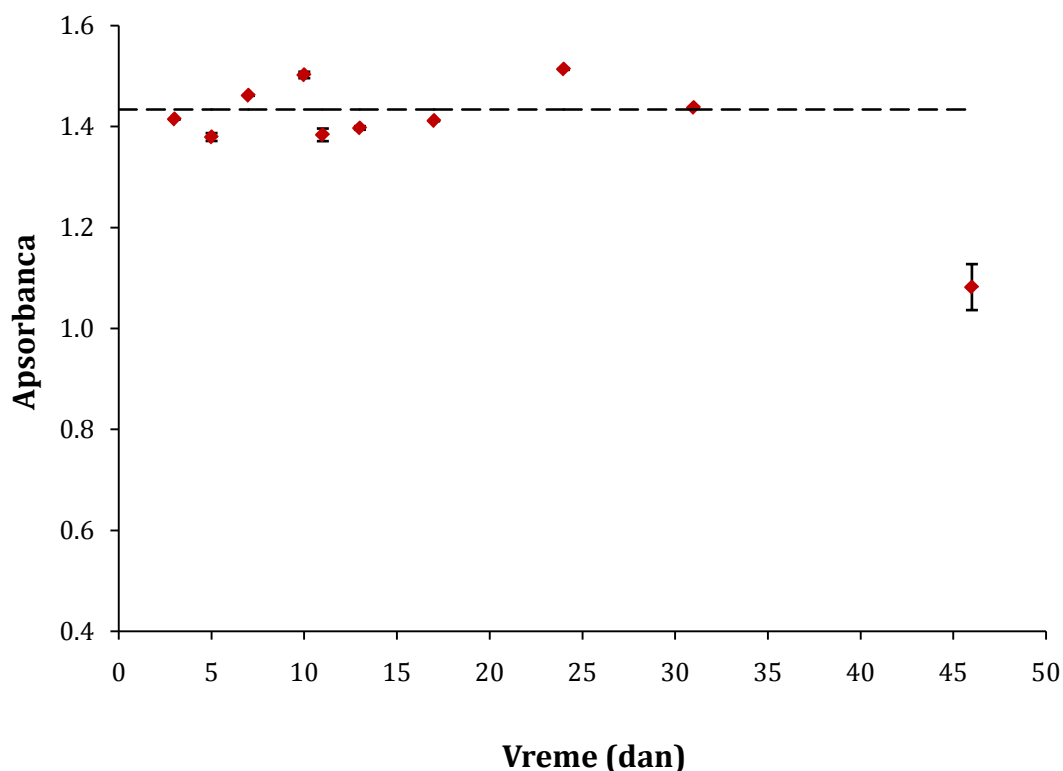
**Slika 4.2.** Zavisnost intenziteta apsorbance na talasnoj dužini od 405 nm za 3,9 mM Ag/alginatni koloidni rastvor od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

Eksperimentalno dobijene vrednosti intenziteta apsorbance u toku vremena na talasnoj dužini od 405 nm su modelovane prema mehanizmu procesa rasta nanočestica predloženom u literaturi (*Richards i sar., 2010*), kao što je opisano u poglavlju 1.4.1, pri tome je usvojeno da je finalni prečnik nanočestica u stabilnom Ag/alginatnom koloidnom rastvoru  $\sim 30$  nm (slika 4.1 insert).

Srednje zapremine nanočestice  $\bar{V}$ , u toku vremena su izračunate na osnovu sferičnog oblika čestice, što je potvrđeno TEM analizom (slika 4.1 insert). Na osnovu eksperimentalnih vrednosti intenziteta apsorbance u toku vremena pretpostavljeno je da aktivan rast nanočestica traje oko 3 dana (slika 4.2). Prema tome na eksperimentalne podatke je primenjena jednačina (1.9) sa parametrima  $w = 2 \text{ min}^{-1}$  i  $\tau_0 \sim 60 \text{ min}$  koji su predloženi u literaturi (*Richards i sar., 2010*), dok su varirani parametri konstanta agregacionog rasta,  $k_g$ , konstanta brzine Ostvaldovog sazrevanja,  $k_0$ , i Avramijev eksponent,  $n$ . Dobro slaganje sa

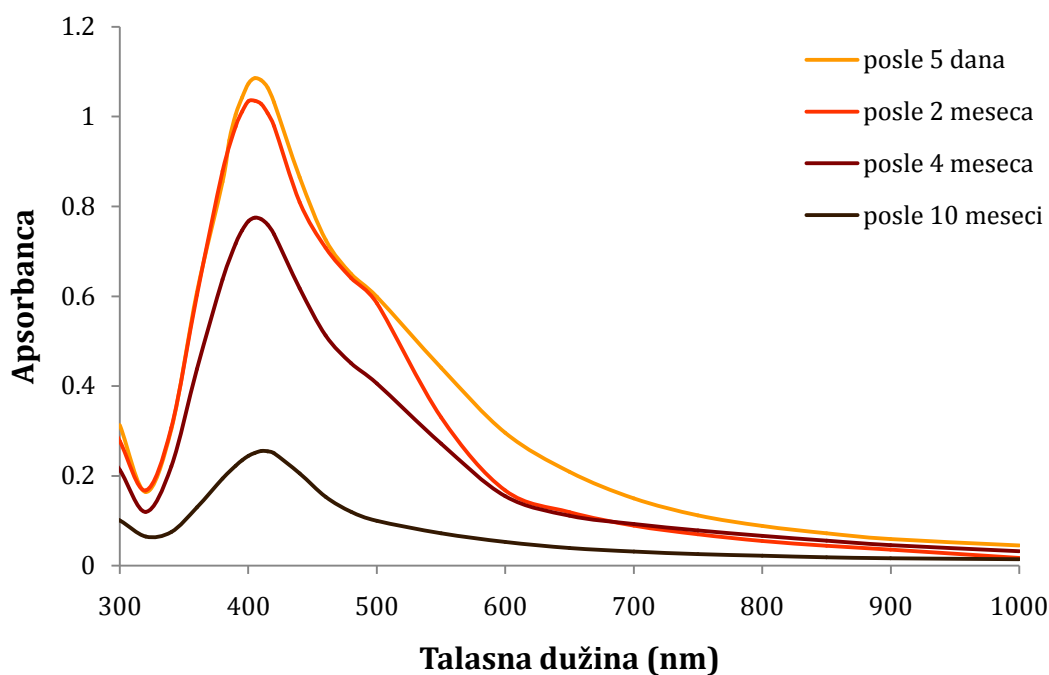
eksperimentalnim podacima je dobijeno za predviđanja modela sa parametrima  $k_g = 0,037 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_0 = 2,7 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  i  $n = 0,68$  (slika 4.2).

Daljim merenjem apsorbance u toku vremena dobijeno je da posle inicijalnog vremena od 3 dana Ag/alginatni koloidni rastvor ostaje stabilan sa maksimalnom apsorbancom na oko 405 nm pri čemu intenzitet maksimalne apsorbance varira manje od 6 % narednih 30 dana, a zatim naglo počinje da opada (slika 4.3).



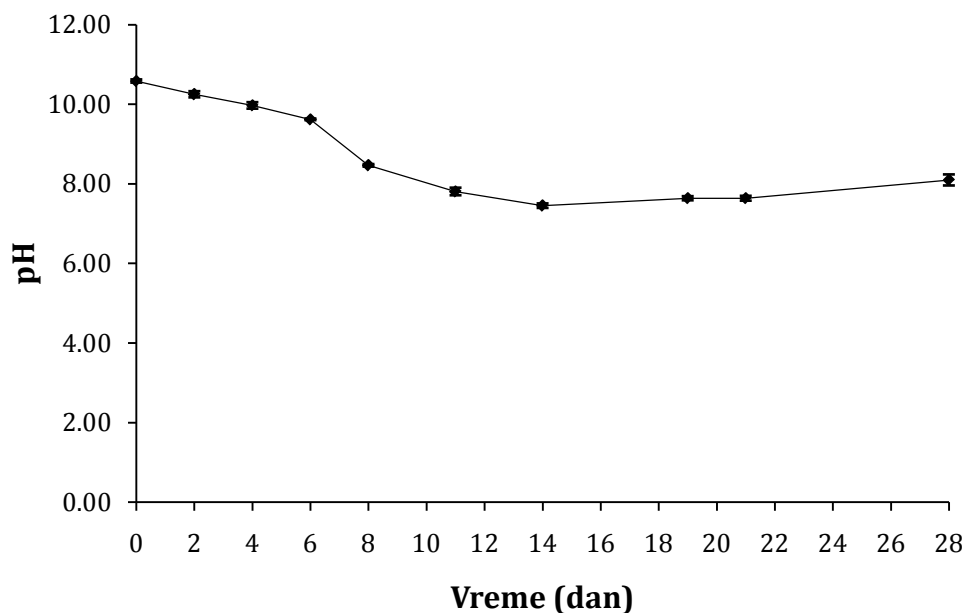
**Slika 4.3.** Zavisnost intenziteta maksimalne apsorbance merene na talasnoj dužini od 405 nm od vremena za 3,9 mM Ag/alginatni koloidni rastvor (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

Međutim, sa daljim porastom vremena starenja ne samo što opada intenzitet maksimalne apsorbance već dolazi i do širenja apsorpcionog spektra što ukazuje na aglomeraciju nanočestica (slika 4.4).



**Slika 4.4.** Apsorpcioni spektri 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora nakon 5 dana, 2, 4 i 10 meseci od elektrohemijske sinteze (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardne devijacije ( $\leq 10\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)

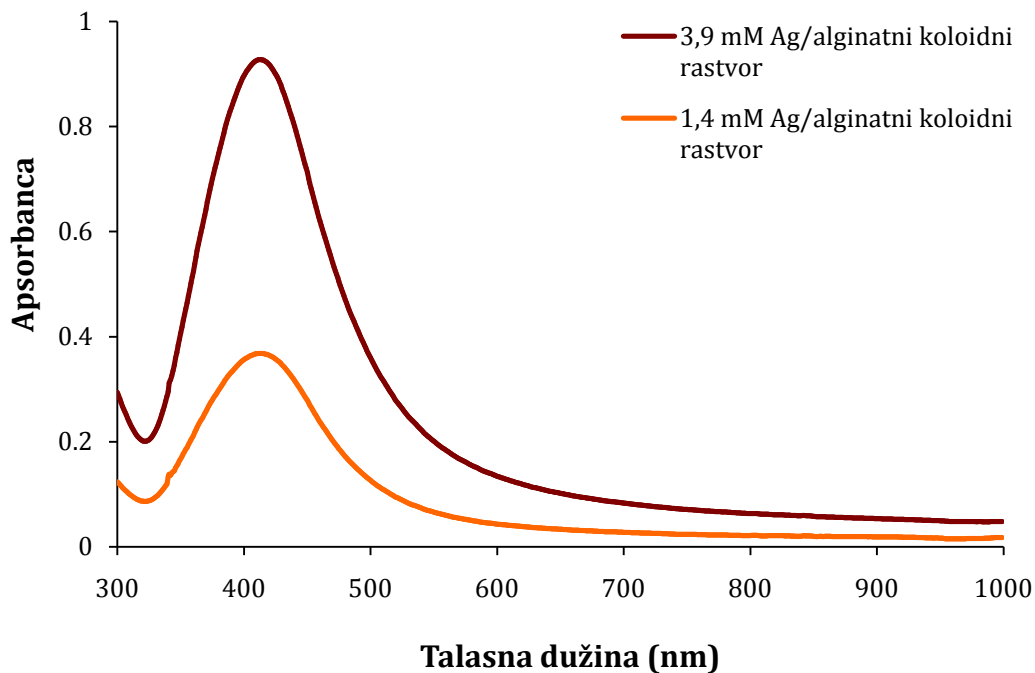
Merenja pH vrednosti 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora su pokazala da u toku 28 dana od razblaživanja ovog rastvora pH vrednosti opadne za oko 2,5 pH jedinice, odnosno od  $10,59 \pm 0,04$  nakon razblaživanja do  $8,1 \pm 0,14$  nakon 28 dana (slika 4.5). Pri tome se pad pH vrednosti odvija u prvih 8 dana, a zatim pH vrednost ostaje približno konstantna do kraja ispitivanog perioda (slika 4.5).



**Slika 4.5.** Zavisnost pH vrednosti od vremena za 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

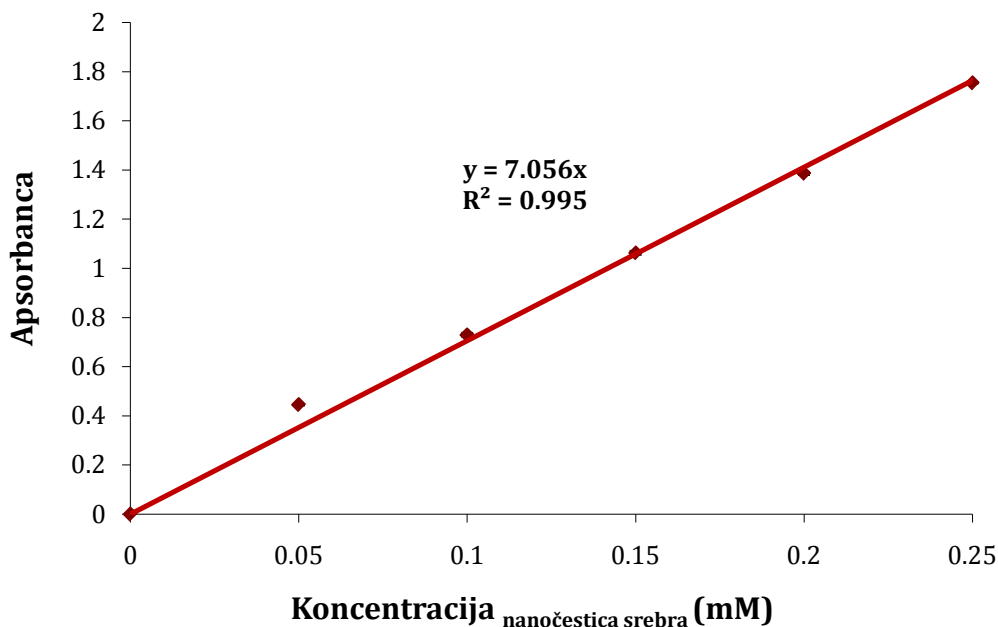
#### 4.1.2 DOBIJANJE Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH RASTVORA RAZLIČITIH KONCENTRACIJA

U cilju ispitivanja mogućnost dobijanja Ag/alginatnih koloidnih rastvora sa različitim koncentracijama nanočestica jednostavnim razblaživanjem, elektrohemijski sintetisani Ag/alginatni koloidni rastvori sa koncentracijom srebra od 3,9 mM su razblaživani 1,9 mas.% rastvorom Na-alginata. Prisustvo nanočestica srebra u razblaženim Ag/alginatnim koloidnim rastvorima je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom. Na slici 4.6 su prikazani apsorpcioni spektari početno sintetisanog koloidnog rastvora i jednog od ispitivanih razblaženih koloidnih rastvora sa koncentracijom nanočestica srebra od 1,4 mM. Može se uočiti maksimalni intenzitet apsorbanse na oko 405 nm u oba slučaja, što ukazuje na očuvanje nanočestica srebra tokom procesa razblaživanja.



**Slika 4.6.** Apsorpcioni spektri elektrohemijski sintetisanog 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora i 1,4 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora dobijenog razblaživanjem početnog koloidnog rastvora (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 15\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)

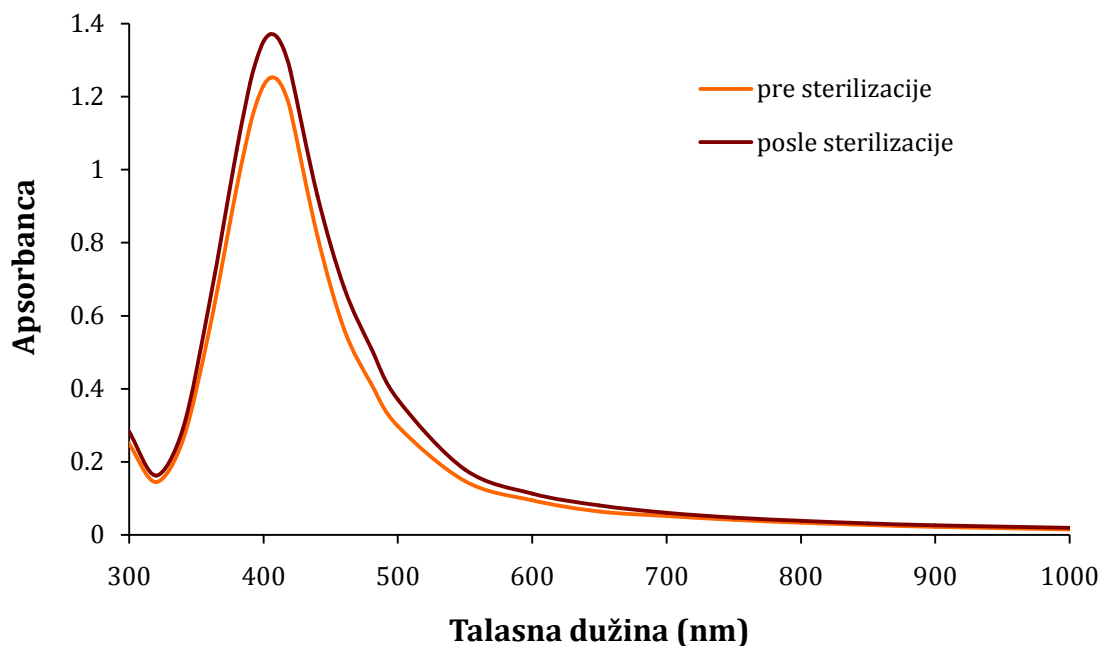
Da bi se odredilo da li je i koncentracija nanočestica srebra očuvana u toku razblaživanja, mereni su intenziteti apsorbance na talasnoj dužini od 405 nm različito razblaženih Ag/alginatnih koloidnih rastvora. Eksperimentalno dobijene vrednosti apsorbance merene na talasnoj dužini od 405 nm su bile linearno proporcionalne izračunatoj koncentraciji nanočestica srebra (slika 4.7) Uz pretpostavku da su sve nanočestice srebra prisutne u početnom 3,9 mM Ag/alginatnom koloidnom rastvoru očuvane, metodom najmanjih kvadratnih odstupanja dobijena je linearna zavisnost apsorbance od predviđene koncentracije nanočestica srebra u razblaženim Ag/alginatnim koloidnim rastvorima ( $r^2 > 0,995$ , slika 4.7).



**Slika 4.7.** Apsorbanca Ag/alginatnih koloidnih rastvora dobijenih razblaživanjem početnog 3,9 mM koloidnog rastvora dodavanjem 1,9 mas.% rastvora Na-alginata merena na talasnoj dužini od 405 nm, kao funkcija izračunate koncentracije nanočestica srebra u rastvoru (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja)

#### 4.1.3 UTICAJ STERILIZACIJE KOLOIDA NA STABILNOST NANOČESTICA

Najjednostavniji metod sterilizacije Ag/alginatnih koloidnih rastvora je ključanjem u toku 30 min uz konstantno mešanje. Sterilnost tako dobijenih rastvora je proverena tako što je uzorak rastvora pomešan sa hranljivim, odnosno sladnim agarom i razliven u Petrijeve šolje. Nakon inkubacije na 30 °C/48 h nije detektovano prisustvo bakterijskih kolonija, kao ni kvasaca. Stabilnost nanočestica srebra je zatim proverena određivanjem UV-vidljivih apsorpcionih spektara koloidnih rastvora pre i posle sterilizacije. Dobijeni rezultati ukazuju da ključanjem koloida intenzitet apsorbance poraste za oko 10 % (slika 4.8), što se može pripisati blagim koncentrovanjem rastvora tokom ključanja ili detekcijom dodatnih nanočestica koje rastu u toku ključanja iz početno prisutnih klica.

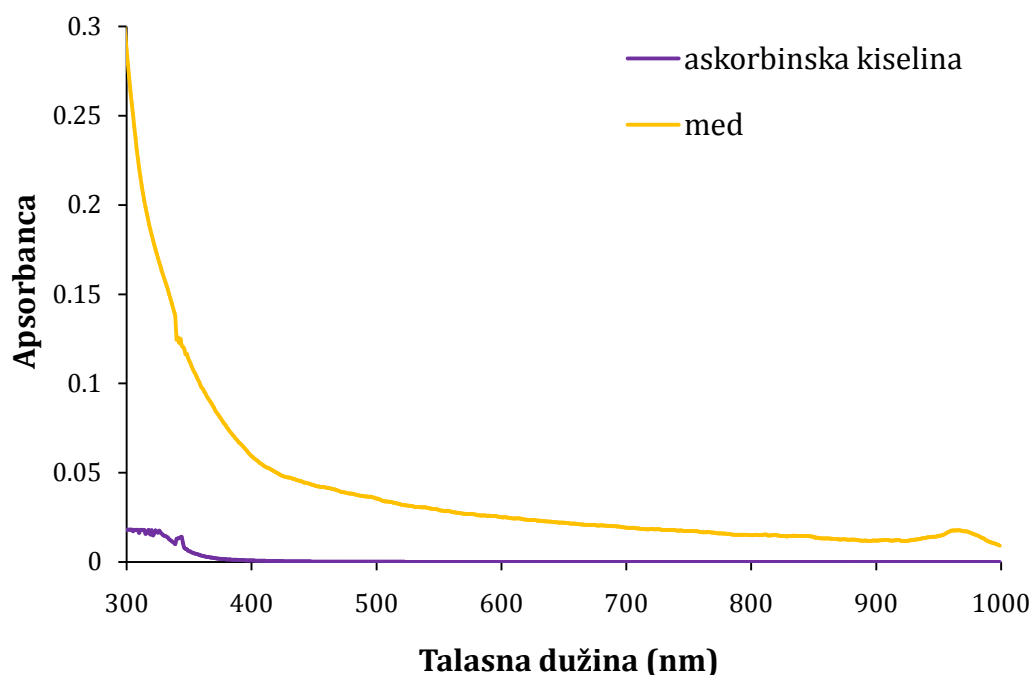


**Slika 4.8.** Apsorpcioni spektri elektrohemijski sintetisanog 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora pre i posle sterilizacije ključanjem od 30 min (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 15\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)

#### 4.1.4 RAZVOJ Ag/ALGINATNIH KOLOIDNIH RASTVORA STABILNIH U BLAGO KISELOJ SREDINI

Elektrohemijski sintetisani Ag/alginatni koloidni rastvori (3,9 mM) imaju pH vrednost oko 11. Ova vrednost je suviše visoka za direktnu primenu u tretmanu rana ako se zna da bazna sredina otežava zarastanje rana (*Gethin, 2006*) i da se pH vrednost rana kreće od 7,15 do 8,9 (*Gethin, 2007*). Takođe, pH vrednost normalne kože se kreće između 4 i 6 u zavisnosti od anatomske lokacije i godina (*Schneider i sar., 2007*). Stoga su u tretmanu rana poželjniji medikamenti koji su blago kiseli. Međutim, pokazano je da se sitne, uniformne nanočestice srebra dobijaju kada se redukcija srebra odvija u alkalnoj sredini (*Leopold i Lendl, 2003, Panáček i sar., 2006, Martinez-Castanon i sar., 2008, Qin i sar., 2010, Stiufiuc i sar., 2013, Mochochoko i sar. 2013*), kao i da je redukcija srebra značajno brža u alkalnoj sredini (*Qin i sar., 2010, Mochochoko i sar., 2013*).

U ovom radu je ispitivana mogućnosti spuštanja pH vrednosti elektrohemijski sintetisanih Ag/alginatnih koloidnih rastvora, bez narušavanja stabilnost nanočestica srebra dodavanjem askorbinske kiseline, odnosno meda.<sup>4</sup> Obe komponente imaju niske pH vrednosti, a koriste se u kozmetičkim i farmaceutskim preparatima za tretman kože. Izmerene pH vrednosti askorbinske kiseline koncentracije 0,1 mg/ml su iznosile  $2,64 \pm 0,05$ , dok su za bagremov med korišćen u ovom radu pH vrednosti  $3,93 \pm 0,07$ . Stabilnost nanočestica srebra u Ag/alginatnim koloidnim rastvorima po dodatku askorbinske kiseline odnosno meda je praćena UV-vidljivom spektroskopijom u toku tri nedelje. Rastvor askorbinske kiseline koncentracije 0,1 mg/ml i med ne pokazuju apsorpcioni pik na relevantnim talasnim dužinama od 400-600 nm (slika 4.9) za razliku od Ag/alginatnih koloidnih rastvora (slika 4.1). Takođe, u ispitivanom vremenu su merene i pH vrednosti rastvora.



**Slika 4.9.** Apsorpcioni spektri rastvora askorbinske kiseline koncentracije 0,1 mg/ml i meda (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 18\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)

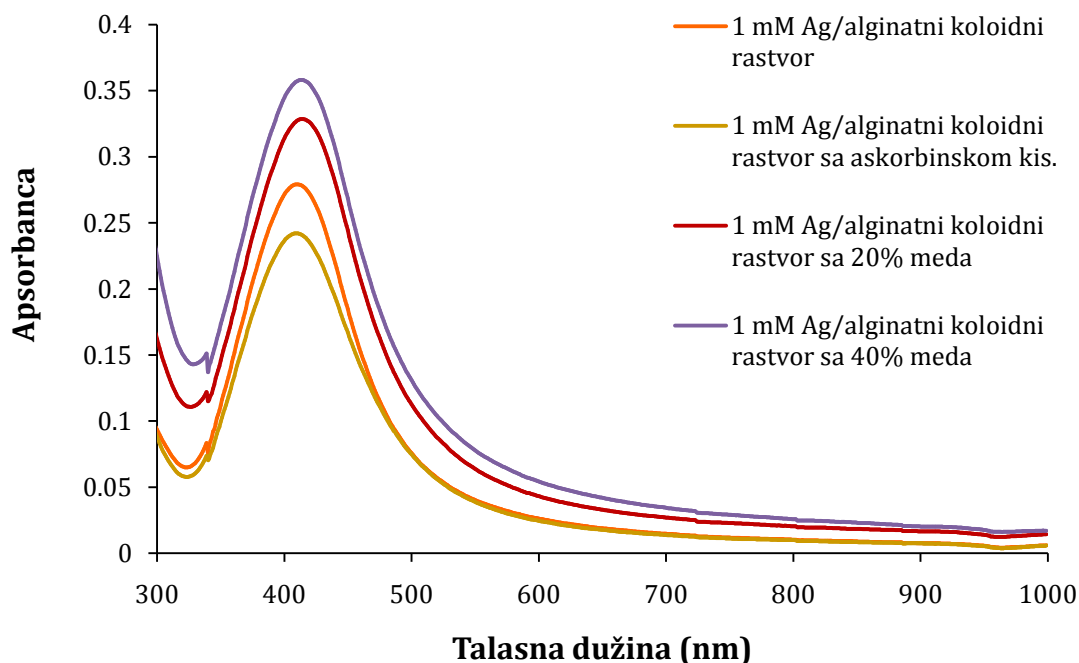
<sup>4</sup> Stojkowska J., Obradovic B., Polimerni nanokompoziti sa inkorporisanim nanočesticama srebra i medom, P-2014/0200, Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije, od 22.04.2014.



U ovoj eksperimentalnoj studiji korišćen je elektrohemijski sintetisan 3,9 mM Ag/alginatni koloidni rastvor koji je nakon stabilizacije imao pH vrednost  $10,77 \pm 0,42$  sa maksimalnim intenzitetom apsorbnace od  $0,834 \pm 0,075$  na talasnoj dužini od 415 nm. Ovaj rastvor je mešan sa 1,73 mas.% rastvorom Na-alginata i rastvorom askorbinske kiseline 12,5 mg/ml, odnosno medom kako bi se dobili različiti rastvori: i) 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor, ii) 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 0,1 mg/ml askorbinske kiseline, iii) 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 5 mas.% meda, iv) 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 10 mas.% meda, v) 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 20 mas.% meda, vi) 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 30 mas.% meda, vii) 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 40 mas.% meda, i viii) 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 50 mas.% meda. U svim rastvorima je koncentracija alginata bila 1,73 mas.%, dok je pH vrednost 1,73 mas.% Na-alginata iznosila  $6,84 \pm 0,04$ .

Zapaženo je da samo razblaživanje 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora Na-alginatnim rastvorom do koncentracije nanočestica srebra od 1 mM dovodi do smanjenja pH vrednosti rastvora za ~1 pH jedinicu tako da je pH vrednost dobijenog rastvora iznosila  $9,98 \pm 0,19$ . Dodavanjem askorbinske kiseline dolazi do daljeg smanjenje pH vrednosti za ~1,5 pH jedinicu (tj. pH= $8,4 \pm 0,15$ ), dok dodavanje meda u koncentraciji od 5, 10, 20, 30, 40 i 50 mas.% dovodi do opadanja pH vrednost za oko 1,6, 2,5, 3,5, 4, 4,5 i 5 pH jedinica redom, odnosno pH vrednosti dobijenih rastvora su iznosile  $8,39 \pm 0,03$ ,  $7,6 \pm 0,06$ ,  $6,57 \pm 0,06$ ,  $5,99 \pm 0,06$ ,  $5,41 \pm 0,15$  i  $4,76 \pm 0,09$ , redom. Može se uočiti da su dobijene pH vrednosti u Ag/alginatnim koloidnim rastvorima sa medom u koncentraciji od 20-40 mas.% u opsegu poželjnih. Vrednosti pH u Ag/alginatnim koloidnim rastvorima sa 0,1 mg/ml askorbinskom kiselinom, odnosno sa medom u koncentraciji 5 mas.% i 10 mas.% su još uvek nešto više od poželjne, dok je pH vrednost u Ag/alginatnom koloidnom rastvoru sa 50 mas.% meda nešto niža od poželjne.

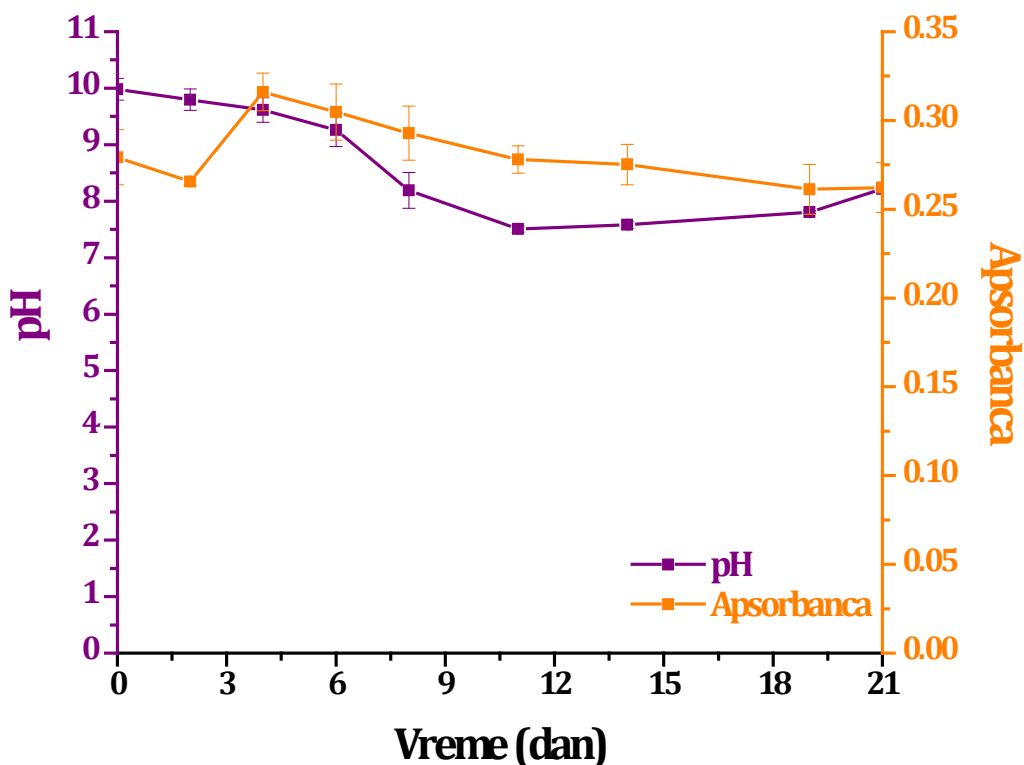
Prisustvo nanočestica srebra u odabranim rastvorima je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom. Na slici 4.10 su prikazani početni apsorpcioni spektri odabranih Ag/alginatnih koloidnih rastvora.



**Slika 4.10.** Početni apsorpcioni spektri 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora, 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 0,1 mg/ml askorbinskom kiselinom, 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 20 i 40 mas.% meda (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)

Na osnovu apsorpcionih spektara se uočava prisustvo nanočestica srebra u svim ispitivanim koloidnim rastvorima sa maksimalnim intenzitetom apsorbanca na talasnoj dužini oko 405-410 nm. Međutim, dodavanje askorbinske kiseline dovodi do blagog smanjenja intenziteta maksimalne apsorbanca za oko 15 %, dok med u koncentraciji od 20 i 40 mas.% dovodi do povećanja intenziteta maksimalne apsorbanca za oko 18 i 28 %, redom, u odnosu na 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor (slika 4.10). I u ovom slučaju zapaženo povećanje apsorbanca se može objasniti mogućim dodatnim rastom klica nanočestica srebra u prisustvu meda.

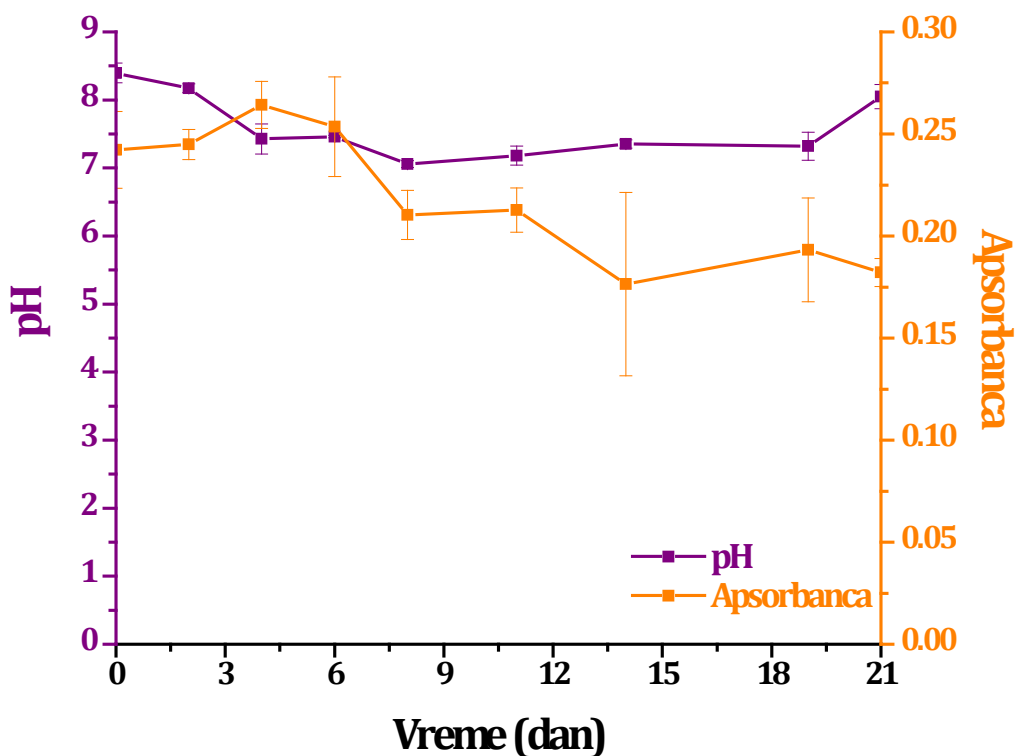
U toku tri nedelje, pH vrednost 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora je postepeno opadala do 11-og dana je iznosila  $7,51 \pm 0,06$ , a zatim dolazi do blagog rasta vrednosti tako da je 21-og dana pH vrednost iznosila  $8,22 \pm 0,07$ . Krajnja vrednost predstavlja oko 82 % početne pH vrednosti, odnosno manja je za oko 2 pH jedinice (slika 4.11). Istovremeno je zapažen blagi porast maksimalnog intenziteta apsorbance 4-og dana za oko 25 % u odnosu na početnu vrednost, a zatim postepeno opada tako da na kraju ispitivanog perioda vrednost maksimalne apsorbance se statistički značajno ne razlikuje od početne (slika 4.11).



**Slika 4.11.** Zavisnosti pH vrednosti i vrednosti maksimalnog intenziteta apsorbance 1 mM Ag/alginatnog koloidnog od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 9 merenja)

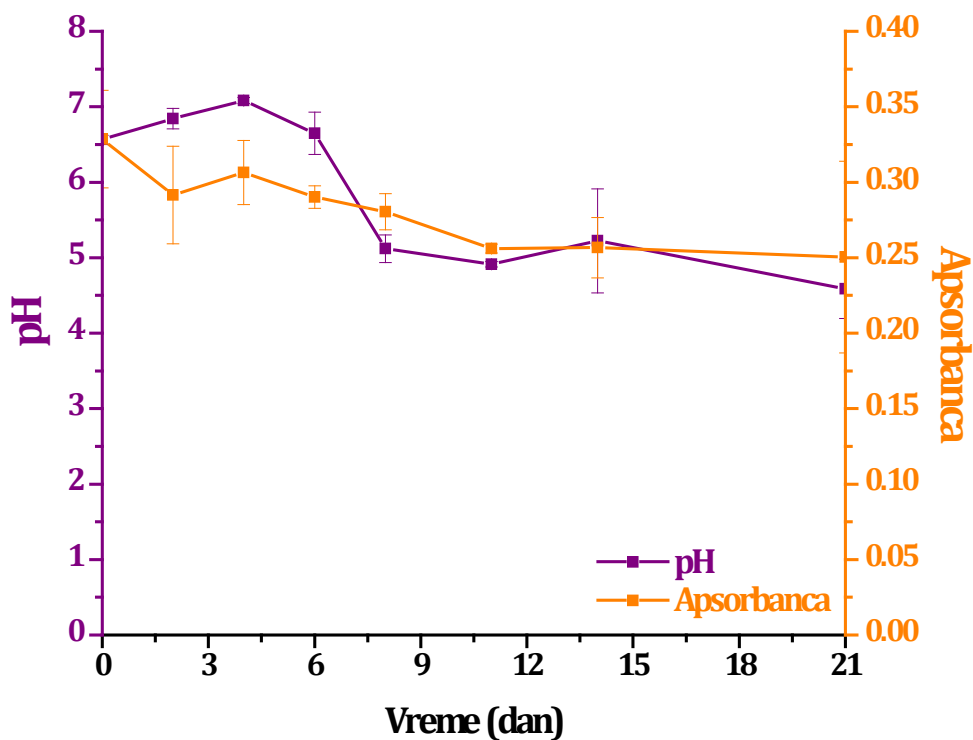
U toku istog vremenskog perioda kod Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa askorbinskom kiselinom je došlo do blagog opadanja pH vrednosti do 8-og dana ( $7,06 \pm 0,05$ ), a zatim je pH vrednost počela da raste približno dostižući početnu vrednost i iznosila je  $8,05 \pm 0,18$  (slika 4.12). Istovremeno je, međutim, zapaženo

da nakon 6 dana od početka eksperimenta dolazi do smanjenja intenziteta maksimalne apsorbance koja opada sve do kraja ispitivanog perioda kada je vrednost apsorbance iznosila ~ 75 % početne vrednosti (slika 4.12).



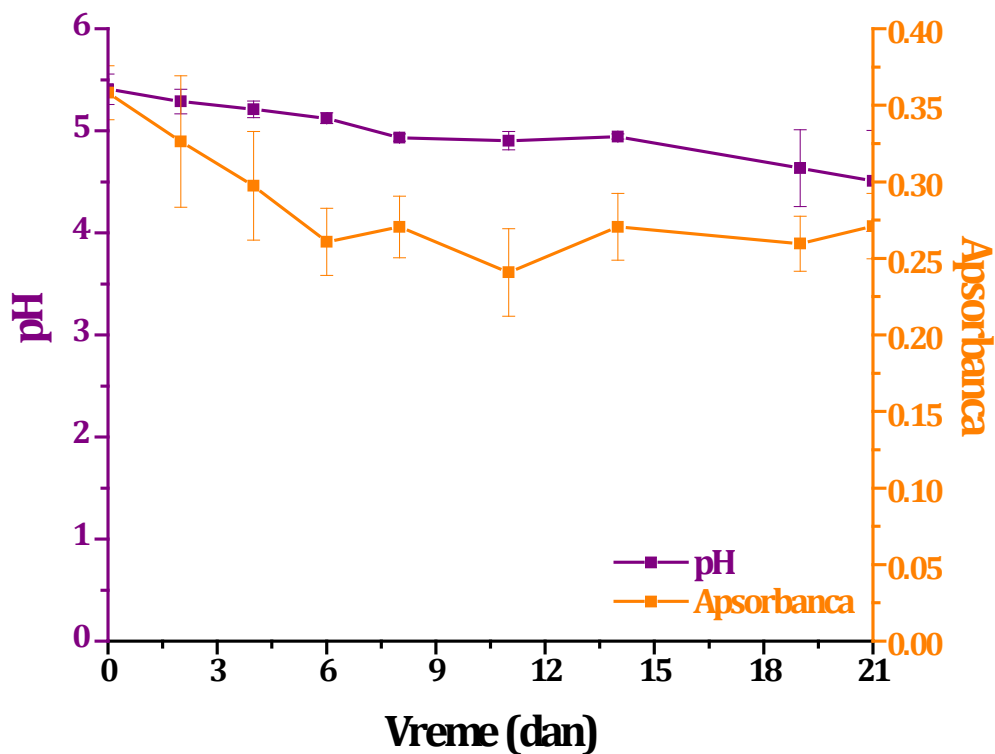
**Slika 4.12.** Zavisnosti pH vrednosti i maksimalnog intenziteta apsorbance 1 mM Ag/alginatnog koloidnog sa 0,1 mg/ml askorbinske kiseline od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 9 merenja)

Izmerena pH vrednost Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 20 mas.% meda je u toku 8 dana bila konstantna, a zatim je naglo opala na vrednost od  $5,12 \pm 0,18$ , što je za oko 1,5 pH jedinicu manje od početne vrednosti, i dalje se nije statistički značajno menjala do kraja ispitivanog perioda (slika 4.13). Istovremeno je vrednost maksimalnog intenziteta apsorbance ovog rastvora postepeno opadala tokom ispitivanog perioda i na kraju je iznosila oko 75 % početne vrednosti (slika 4.13).



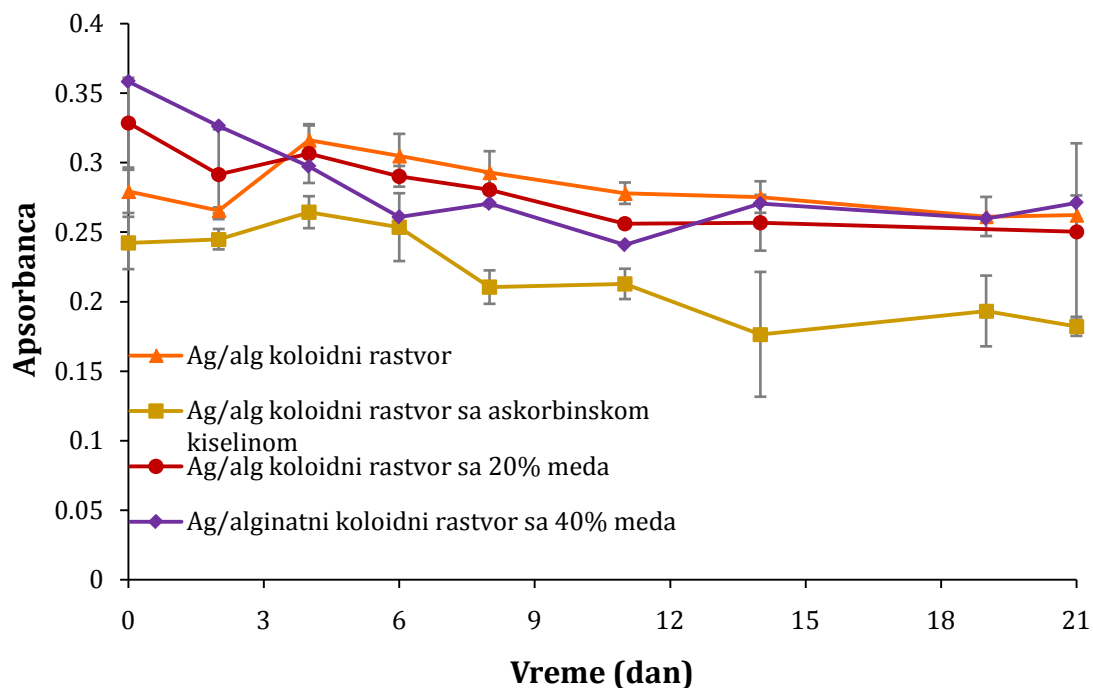
**Slika 4.13.** Zavisnosti pH vrednosti i maksimalnog intenziteta apsorbance 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 20 mas.% meda od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 9 merenja)

Praćenje pH vrednosti Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 40 mas.% meda u toku 3 nedelje je pokazalo da ne dolazi do statistički značajnih promena tako da je pH vrednosti na kraju eksperimenta iznosila  $4,51 \pm 0,49$  (slika 4.14). Istovremeno je došlo do postepenog opadanja maksimalnog intenziteta apsorbance do šestog dana od početka eksperimenta kada je vrednost iznosila  $0,26 \pm 0,02$ , što je oko 73 % početne vrednosti, nakon čega se nije statistički značajno menjala do kraja ispitivanog perioda (slika 4.14).



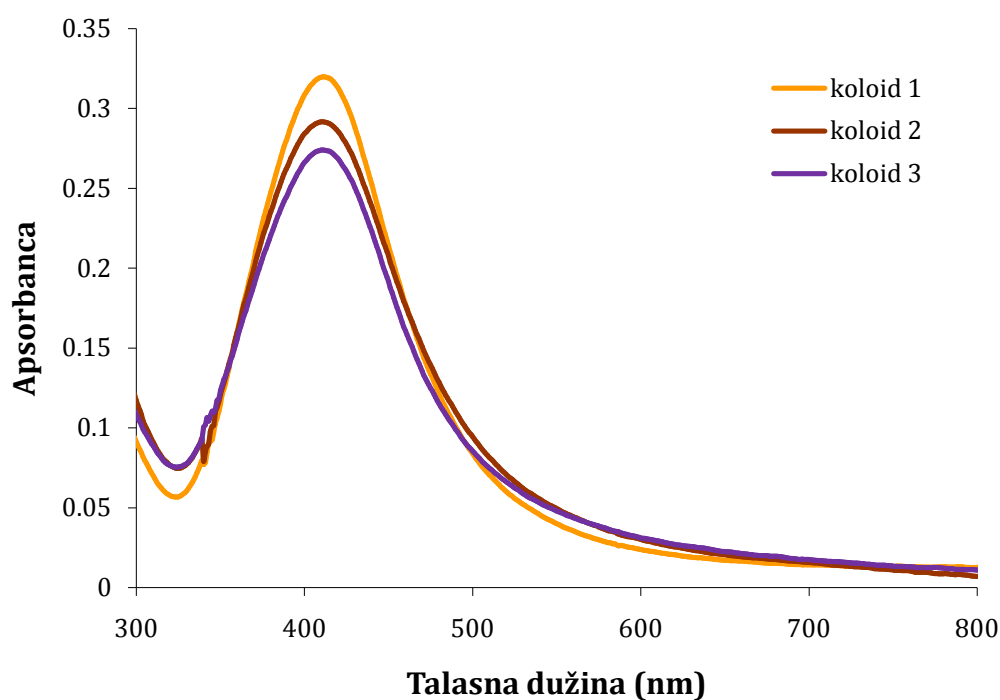
**Slika 4.14.** Zavisnosti pH vrednosti i intenziteta maksimalne apsorbance 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 40 mas.% meda od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 9 merenja)

Na slici 4.15 je prikazano poređenje vrednosti maksimalnog intenziteta apsorbance Ag/alginatnih koloidnih rastvora različitih grupa u toku vremena. Može se zaključiti da med stabilizuje nanočestice srebra jer nema značajne statističke razlike između vrednosti maksimalnog intenziteta apsorbance u toku vremena uzoraka sa 20, odnosno 40 mas.% meda i uzoraka bez meda. Istovremeno su uzorci sa medom doveli do značajnog snižavanja pH vrednosti u opsegu željenih vrednosti. Pri tome je do najmanje promene u pH vrednosti tokom ispitivanog perioda došlo kod Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 40 mas.% meda koja je bila u opsegu 4,5-5,5. S druge strane prisustvo askorbinske kiseline posle 6 dana počinje da destabilizuje nanočestice srebra što se odražava u smanjenju vrednosti maksimalnog intenziteta apsorbance (slika 4.15).



**Slika 4.15.** Zavisnost maksimalnog intenziteta apsorbance od vremena za 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor, 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 0,1 mg/ml askorbinske kiseline, 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 20 i sa 40 mas.% meda (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost 9 merenja)

U cilju ispitivanja funkcionalnosti Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa askorbinskom kiselinom za zarastanje rana izvedena su *in vivo* ispitivanja na opekotinama II stepena na pacovima u kojima je Ag/alginatni koloidni rastvor upoređen sa komercijalnom kremom i netretiranom kontrolnom grupom (poglavlje 4.4.1.1.). Ukratko, elektrohemijski su sintetisana 3 koloidna rastvora. Odmah nakon stabilizacije 3,9 mM Ag/alginatni koloidni rastvori su razbaženi 1,73 mas.% Na-alginatom i sterilisani ključanjem. Nakon hlađenja pH vrednost je spuštена pomoću askorbinske kiseline (0,1 g/ml) i iznosila je oko 7. Prisustvo nanočestica srebra u Ag/alginatnim koloidnim rastvorima je potvrđena UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.16). Apsorpcioni spektri ukazuju na prisustvo nanočestica srebra nakon dodavanja askorbinske kiseline, kao i na neznatno variranje intenziteta maksimalne apsorbance između koloidnih rastvora. Svi rastvori su upotrebljeni u toku 5, odnosno 10 dana u periodu u kom stabilnost nanočestica srebra nije značajno narušena (slika 4.12).



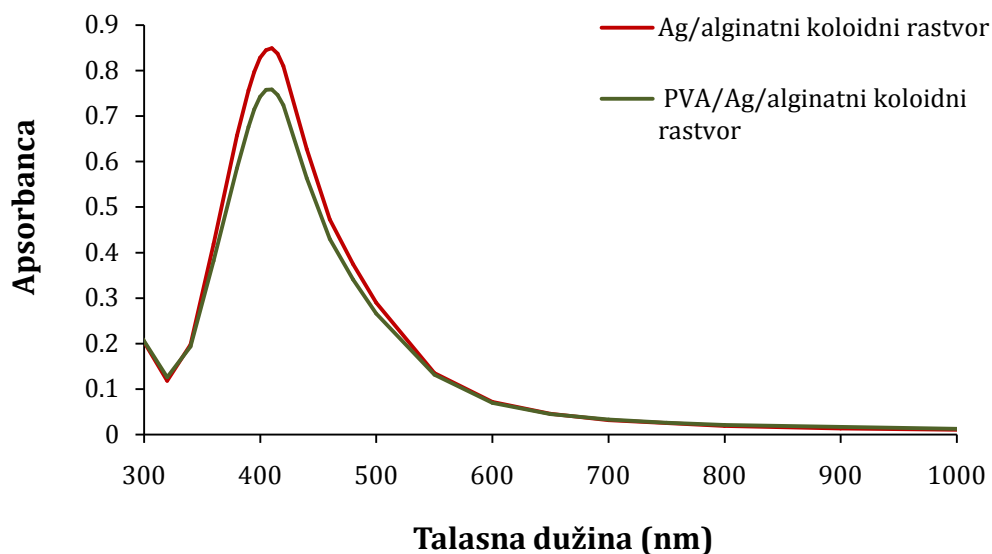
**Slika 4.16.** Apsorpcioni spektri tri nezavisno sintetisana 1 mM Ag/alginatna koloidna rastvora sa askorbinskom kiselinom (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)

#### 4.1.5 DOBIJANJE NANOKOMPOZITNIH POLIMERNIH SMEŠA NA BAZI ALGINATA I NANOČESTICA SREBRA

Nanokompoziti na bazi više polimera mogu imati dodatna povoljna svojstva kao npr. poboljšane mehaničke karakteristike i stabilnost. U ovom radu, ispitivana je mogućnost mešanja Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa rastvorom PVA. Pri čemu je finalna koncentracija PVA, alginata i srebra bila 5,6 mas.%, 1,26 mas.% i 2,6 mM, redom.

Prisustvo nanočestica srebra u dobijenom PVA/Ag/alginatnom koloidnom rastvoru je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.17).





**Slika 4.17.** Apsorpcioni spektri Ag/alginatnog koloidnog rastvora koncentracija nanočestica srebra 2,6 mM i alginata 1,26 mas.% i PVA/Ag/alginatnog koloidnog rastvora koncentracija PVA 5,6 mas.%, nanočestica srebra 2,6 mM i alginata 1,26 mas.% (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 8\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)

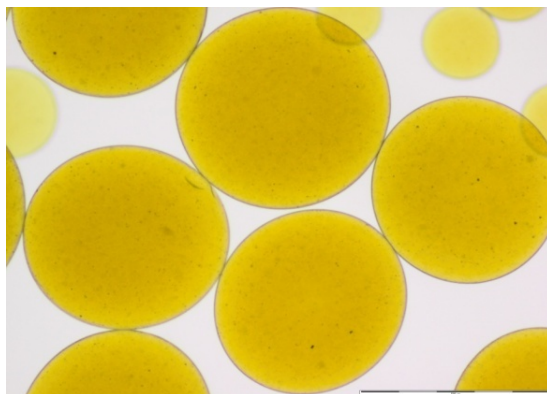
Dobijeni rezultati su pokazali da je dodavanjem PVA u Ag/alginatni koloidni rastvor intenzitet apsorbance opao za oko 10 %, što statistički nije značajno smanjenje što ukazuje da se Ag/alginatni koloidni rastvor može mešati sa rastvorima drugih polimera uz očuvanje nanočestica srebra.

## 4.2 DOBIJANJE NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA NA BAZI ALGINATA I NANOČESTICA SREBRA

### 4.2.1 DOBIJANJE Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA PRIMENOM ELEKTROSTATIČKE EKSTRUZIJE

Nanokompozitne alginatne mikročestice sa inkorporisanim nanočesticama srebra su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom Ag/alginatnih koloidnih rastvora

sa različitim koncentracijama nanočestica srebra.<sup>5</sup> Na ovaj način su dobijene uniformne mikročestice precizno kontrolisane veličine pri čemu žuto obojenje ukazuje na prisustvo nanočestica srebra (slika 4.18).

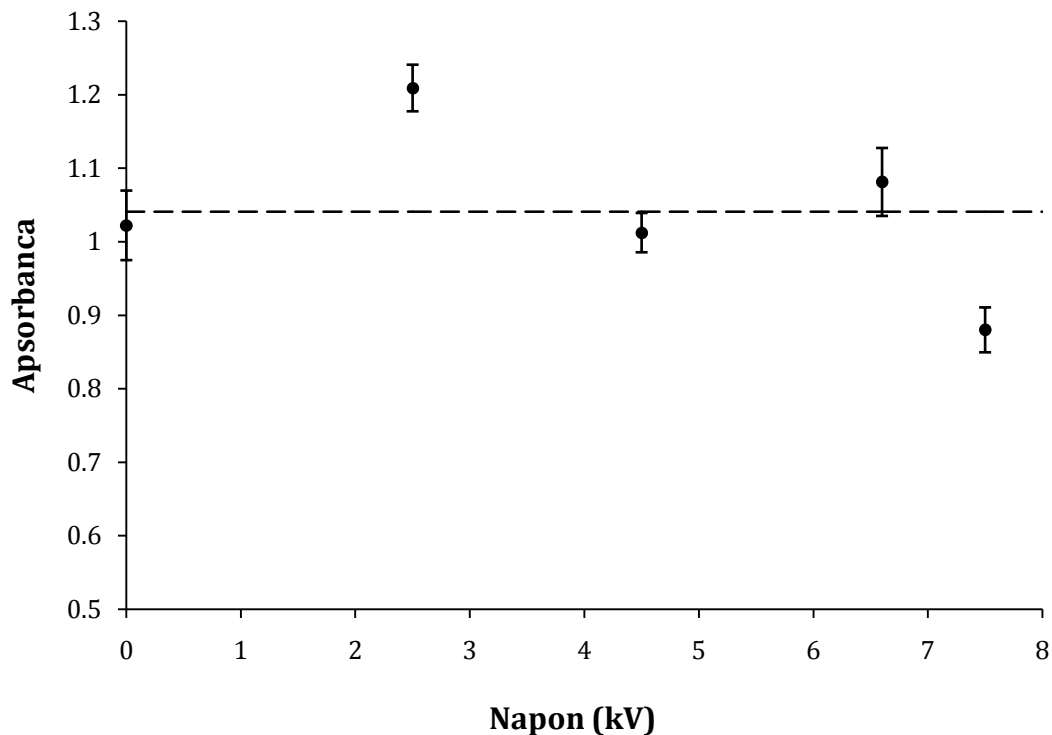


**Slika 4.18.** Optička mikrofotografija Ag/alginatnih mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ )

Da bi se ispitaio uticaj elektrostatičke ekstruzije na stabilnost nanočestica srebra u koloidnom rastvoru, Ag/alginatni koloidni rastvor je potiskivan kroz pozitivno naelektrisane igle pri različitim elektrostatičkim naponima (0-7,5 kV). UV-vidljivi spektri rastvora pre i nakon ekstruzije su upoređeni i dobijene vrednosti intenziteta maksimalne apsorbance pri svim ispitivanim naponima se nisu statistički značajno razlikovale (slika 4.19). Srednja vrednost intenziteta maksimalne apsorbance za sve ispitivane napone je bila  $1,04 \pm 0,12$ , što predstavlja odstupanje od 12 %.

---

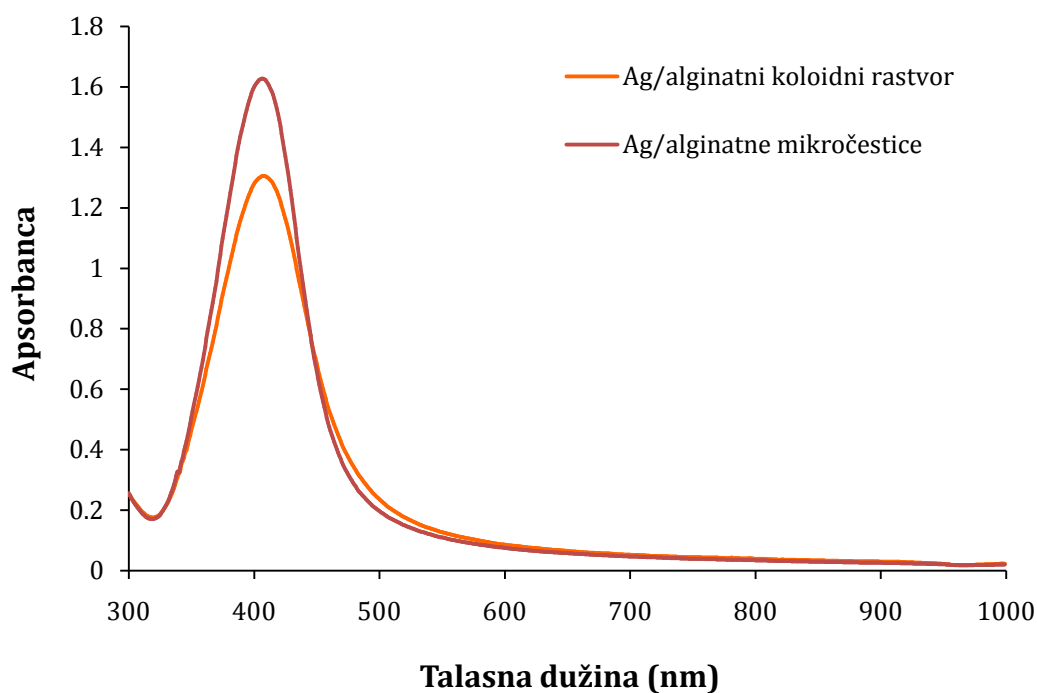
<sup>5</sup> Obradović B., Mišković-Stanković V., Jovanović Ž., Stojkowska J., Dobijanje mikročestica hidrogela alginata sa inkorporisanim nanočesticama srebra, (Production of alginate microbeads with incorporated silver nanoparticles), patent br. RS53508 (B1), Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije, od 27.02.2015.



**Slika 4.19.** Intenzitet maksimalne apsorbanca Ag/alginatnog koloidnog rastvora pre (isprekidana linija) i nakon ekstruzije (simboli) u zavisnosti od primenjenog elektrostatičkog napona (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

Takođe, ispitan je i uticaj Na-citrata na stabilnost nanočestica srebra prilikom rastvaranja mikročestica u proceduri određivanja koncentracije nanočestica UV-vidljivom spektroskopijom. U Ag/alginatni koloidni rastvor je dodat Na-citrata koncentracije 2 mas.% (68 mM). Praćena je stabilnost nanočestica srebra u prisustvu Na-citrata u toku 60 min. Pri tom nije došlo do značajne promene u vrednosti maksimalne apsorbanca na talasnoj dužini od 405 nm, jer je intenzitet apsorbanca pre dodavanja Na-citrata iznosio  $0,143 \pm 0,014$ , dok je nakon 60 min po dodavanju Na-citrata apsorbanca iznosila  $0,146 \pm 0,031$  što je ~2 % razlike tako da se uticaj Na-citrata može zanemariti.

Nakon ovih ispitivanja prisustvo nanočestica srebra u mikročesticama dobijenim elektrostatičkom ekstruzijom je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom nakon rastvaranja mikročestica u rastvoru Na-citrata (slika 4.20).

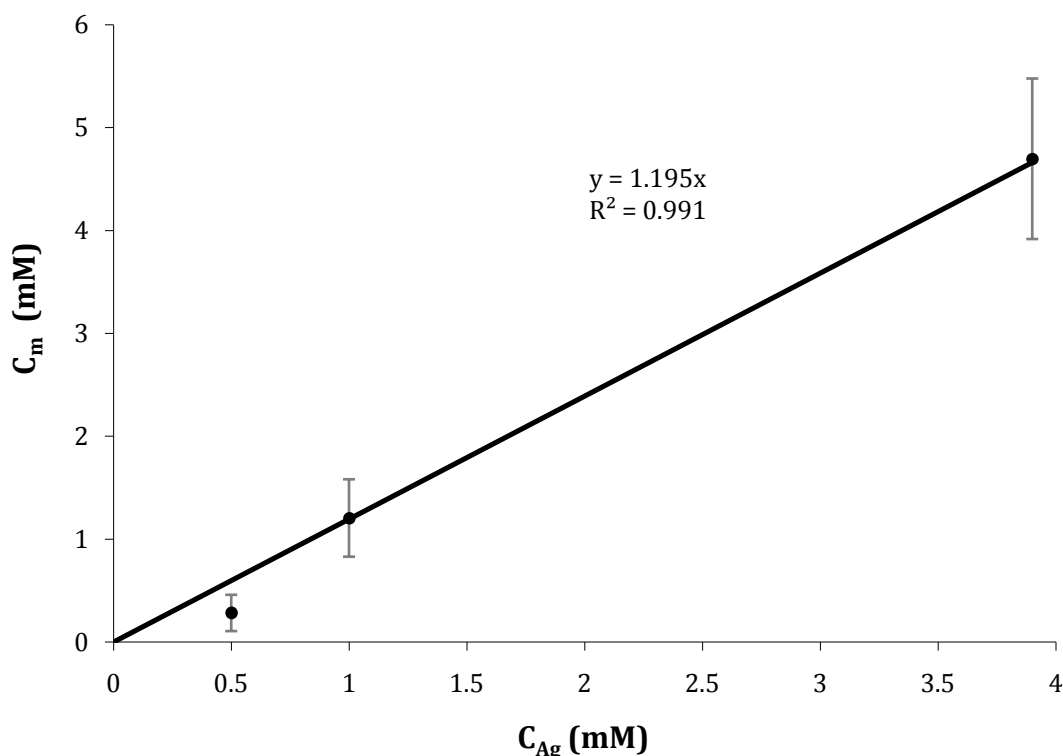


**Slika 4.20.** Apsorpcioni spektri 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora i Ag/alginatnih mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom datog rastvora (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 10\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)

Na osnovu apsorpcionog spektra i nepromenjenog položaja pika u odnosu na koloidni rastvor jasno se može uočiti da nanočestice srebra i nakon elektrostatičke ekstruzije ostaju očuvane u mikročesticama. Vrednost maksimalne veća na talasnoj dužini oko 405 nm je nešto viši kod nanokompozitnih mikročestica nego kod koloida od koga su dobijene mikročestice (slika 4.20), što ukazuje na veću koncentraciju nanočestica u mikročesticama.

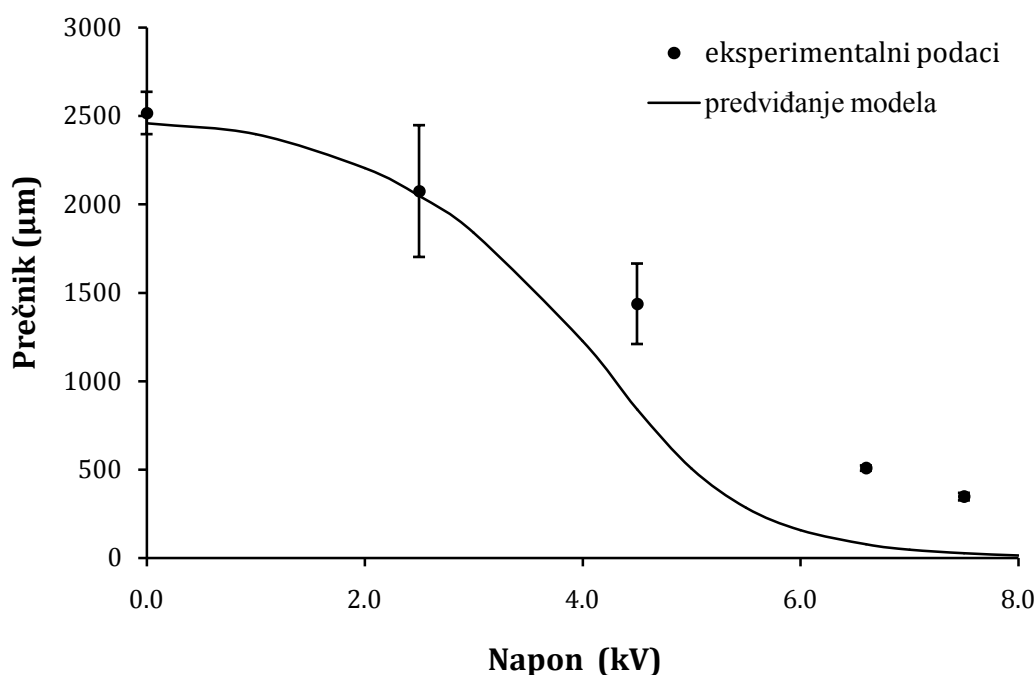
Merenjem koncentracije srebra u mikročesticama nakon rastvaranja u Na-citratu i oksidacije nanočestica pomoću azotne kiseline (poglavlje 3.14.3) pomoću atomske apsorpcione spektroskopijom su takođe potvrđene veće koncentracije srebra u mikročesticama u odnosu na nominalne koncentracije srebra u odgovarajućim Ag/alginatnim koloidnim rastvorima (slika 4.21). Može se uočiti da je koncentracija srebra u mikročesticama u proseku za  $\sim 20\%$  veća, u odnosu na rastvor, osim u slučaju mikročestica dobijenih ekstruzijom 0,5 mM

Ag/alginatnog koloidnog rastvora gde je koncentracija u mikročesticama nešto manja ( $0,28 \pm 0,11$  mM). Dobijeni rezultati se mogu objasniti uticajem elektrostatičke ekstruzije i blagim skupljanjem gela u toku geliranja.



**Slika 4.21.** Koncentracija srebra u mikročesticama,  $C_m$ , kao funkcija nominalne koncentracije srebra u odgovarajućim početnom Ag/alginatnim koloidnim rastvorima,  $C_{Ag}$  (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 4 merenja)

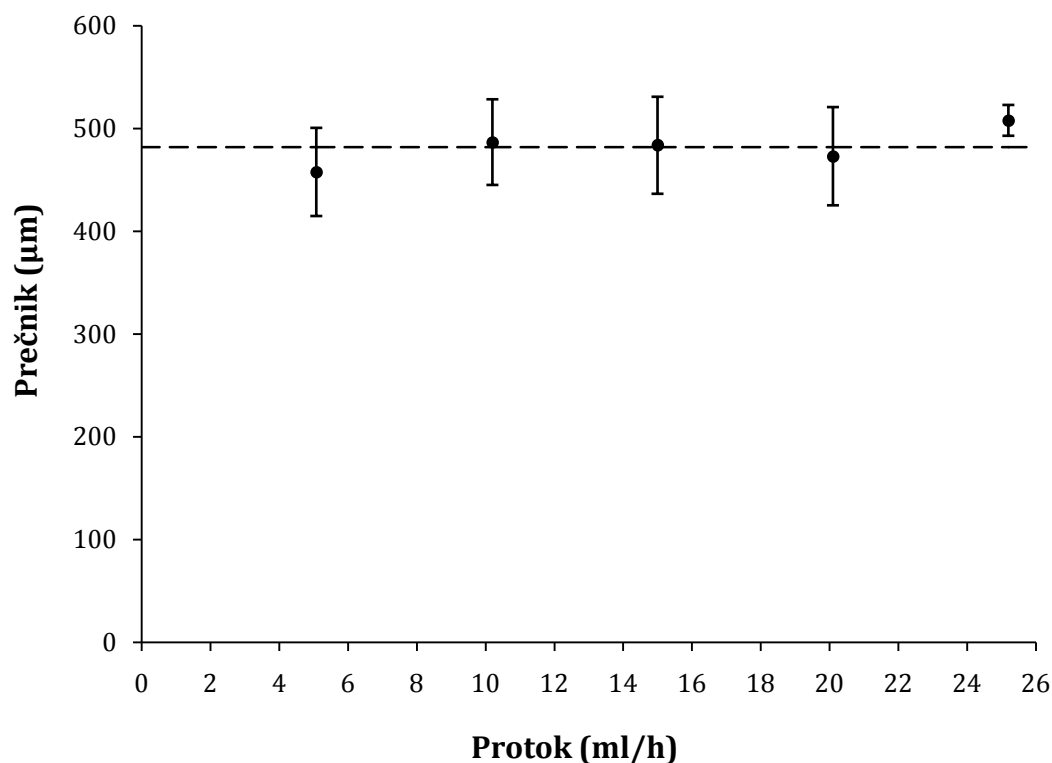
U cilju razvoja kontrolisanog postupka dobijanja Ag/alginatnih mikročestica ispitivan je uticaj primenjenog elektrostatičkog napona na veličinu mikročestica, u opsegu 0-7,5 kV, pri konstantnom rastojanju između elektroda i protoku 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora (poglavlje 3.6). Eksperimentalno dobijeni rezultati su ukazali na očekivan uticaj elektrostatičkog napona na veličinu nanokompozitnih čestica (slika 4.22), slično kao pri ekstruziji čistog rastvora Na-alginata (*Poncelet i sar, 1999*).



**Slika 4.22.** Zavisnost prečnika Ag/alginatnih čestica od primenjenog elektrostatičkog napona (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 20 merenja)

Zavisnost prečnika mikročestica od primenjenog elektrostatičkog napona je modelovana primenom jednačine (1.8), pri čemu je gustina Ag/alginatnog koloidnog rastvora izmerena kao  $1026 \pm 2 \text{ kg/m}^3$ , a površinski napon je usvojen kao  $0,074 \text{ N/m}$  prema podacima iz literature (Bugarski i sar., 2006). Prečnik igle je iznosio  $0,337 \text{ mm}$  (za iglu od 23 G). Predviđanja modela su prikazana na slici 4.22 i u kvalitativnoj su saglasnosti sa eksperimentalno dobijenim podacima, pri čemu model predviđa naglije smanjenje prečnika mikročestica u regionu kritičnog elektrostatičkog napona (4–5 kV).

Najzad, ispitan je i uticaj protoka Ag/alginatnog koloidnog rastvora na veličinu dobijenih mikročestica. Protok  $3,9 \text{ mM}$  Ag/alginatnog koloidnog rastvora je variran u opsegu  $5,1\text{-}25,2 \text{ ml/h}$ , dok su elektrostatički napon iznosio i rastojanje između elektroda bili konstantni (poglavlje 3.6). Eksperimentalno dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.23 i ukazuju da protok ne utiče na veličinu mikročestica, pri čemu je srednja vrednost prečnika iznosila  $480 \pm 20 \text{ μm}$ .



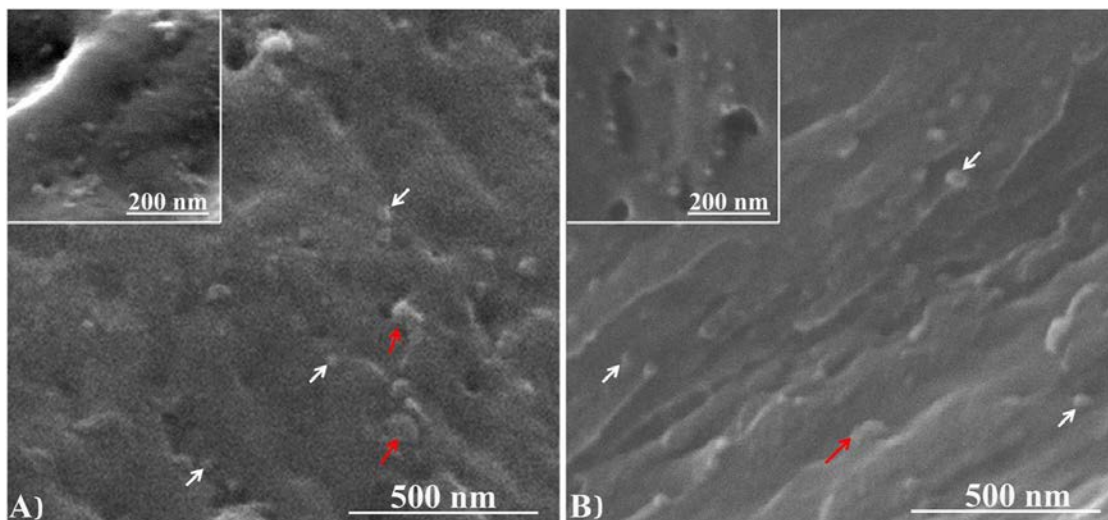
**Slika 4.23.** Zavisnost prečnika mikročestica od protoka Ag/alginatnog koloidnog rastvora tokom elektrostatičke ekstruzije (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 20 merenja)

#### 4.2.2 DOBIJANJE I REHIDRATACIJA SUVIH Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA

U ovom radu je ispitivana mogućnost sušenja i rehidracije nanokompozitnih Ag/alginatnih mikročestica radi potencijalne primene kao suvih praškova u tretmanu rana. Ag/alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom su podvrgnute sušenju, a zatim rehidraciji u fiziološkom rastvoru, odnosno vodi.

U prvoj eksperimentalnoj seriji Ag/alginatne mikročestice (prečnik  $760 \pm 30 \mu\text{m}$ ) sa koncentracijom nanočestica srebra od  $4,87 \pm 0,05 \text{ mM}$  su sušene na sobnoj temperaturi do konstantne mase koja je iznosila oko 5 % početne mase mikročestica. Suve mikročestice su ostale relativno sferične (prečnik  $240 \pm 30 \mu\text{m}$ ) i sačuvale su veći procenat nanočestica srebra što je potvrđeno FE-SEM analizom i UV-vidljivom spektroskopijom. FE-SEM analiza je pokazala da se u unutrašnjosti vlažnih, kao i suvih mikročestica nalaze pojedinačne nanočestice srebra prečnika

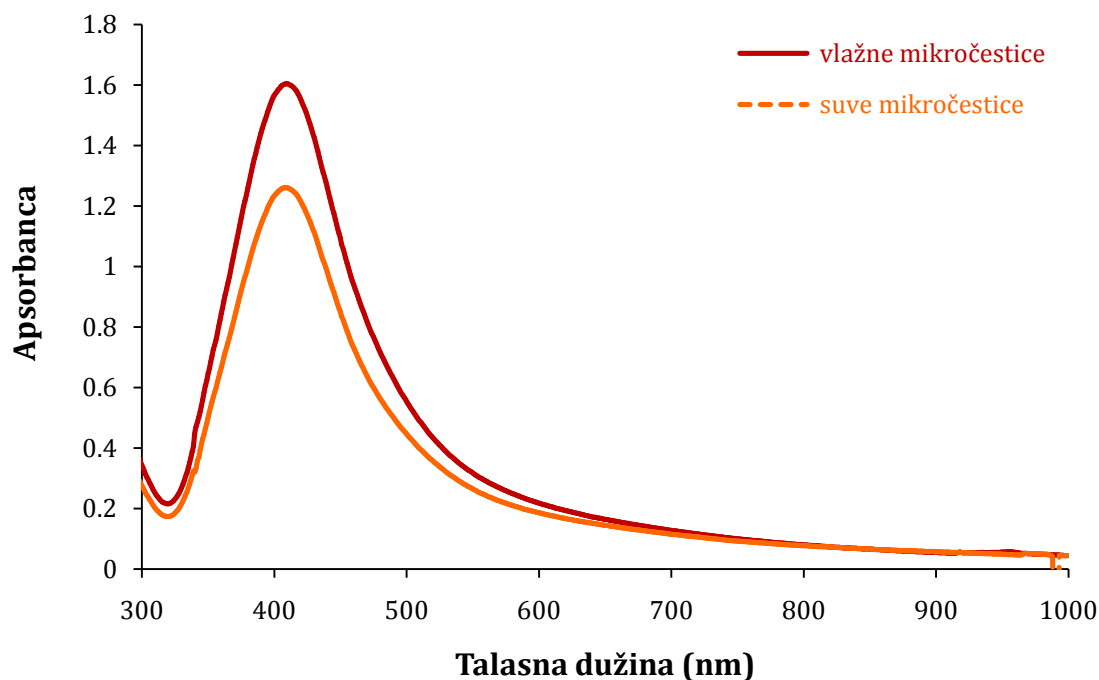
oko 10-30 nm (slika 4.24), što odgovara veličini nanočestica u Ag/alginatnom rastvoru koja je određena transmissionom elektronskom mikroskopijom (slika 4.1 insert). Takođe, na poprečnim presecima i vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica mogu se sporadično uočiti agregati više nanočestica (slika 4.24).



**Slika 4.24.** FE-SEM mikrofotografije poprečnih preseka vlažnih (A) i suvih (B) Ag/alginatnih mikročestica; bele strelice označavaju individualne nanočestice srebra, dok crvene pokazuju agregate nanočestica (razmernik: 500 nm)

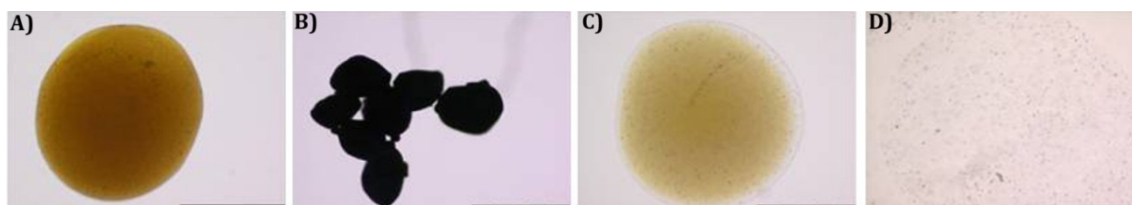
Na slici 4.25 su prikazani apsorpcioni UV-vidljivi spektri početnih vlažnih i osušenih Ag/alginatnih mikročestica nakon rastvaranja u rastvoru Na-citrata. Može se uočiti da je maksimalna apsorbanca i nakon sušenja ostala na talasnoj dužini od ~405 nm, ali se intenzitet smanjio za oko 20 % u odnosu na intenzitet maksimalne apsorbanca inicijalnih vlažnih mikročestica. Ovaj rezultat se može objasniti agregacijom nanočestica srebra u toku sušenja što je i očekivano.





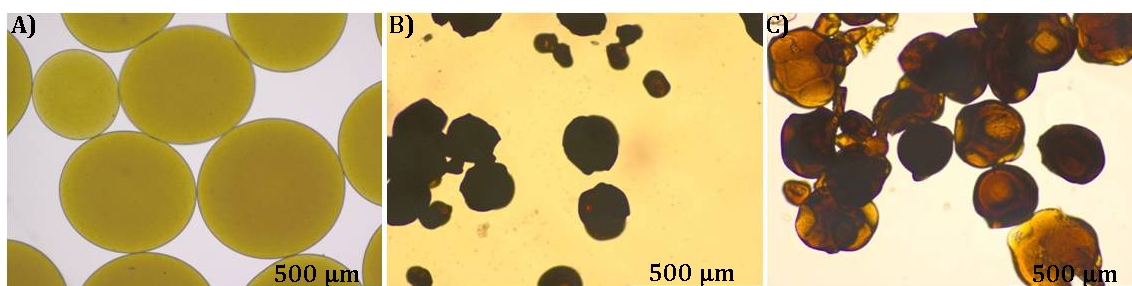
**Slika 4.25.** Apsorpcioni spektri početnih vlažnih i osušenih Ag/alginatnih mikročestica nakon rastvaranja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 10\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

Mogućnost rehidracije suvih Ag/alginatnih mikročestica je zatim ispitivana u fiziološkom rastvoru na sobnoj temperaturi. Eksperiment je paralelno izvođen sa vlažnim i suvim mikročesticama, pri čemu su inicijalne vlažne mikročestice imale intenzitet maksimalne apsorbance od  $0,324 \pm 0,005$ . Izgled suvih mikročestica u toku 5 dana rehidracije je prikazan na slici 4.26. Nakon 24 h u fiziološkom rastvoru inicijalne vlažne, kao i suve mikročestice povećale su svoju veličinu i dostigle srednji prečnik od  $1000 \pm 40$  i  $1020 \pm 40 \mu\text{m}$ , redom. Pri tom je u oba slučaja došlo do obezbojavanja mikročestica što je ukazalo na gubitak nanočestica srebra. Intenziteti apsorbance na talasnoj dužini od 405 nm nakon rastvaranja mikročestica su iznosili  $0,018 \pm 0,004$  i  $0,026 \pm 0,004$  za vlažne i suve mikročestice, redom, tako da se može izračunati da je gubitak nanočestica u odnosu na početne vlažne mikročestice iznosio 90-95 %. Posle 5 dana u fiziološkom rastvoru došlo je do pucanja mikročestica, dok se nanočestice nisu više mogle detektovati UV-vidljivom spektroskopijom.



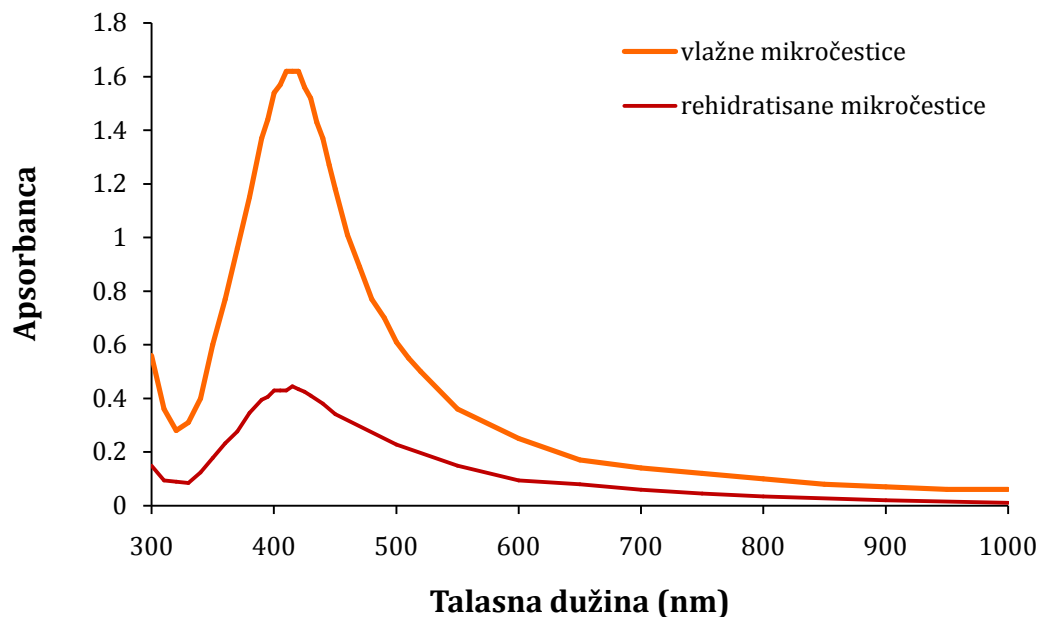
**Slika 4.26.** Rehidracija suvih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru: A) reprezentativna vlažna mikročestica; B) suve mikročestice; C) reprezentativna suva mikročestica nakon 24 h rehidracije; D) reprezentativna suva mikročestica nakon 5 dana rehidracije (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ )

U analognoj studiji, vlažne Ag/alginatne prečnika  $550 \pm 30 \mu\text{m}$  su sušene na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Suve mikročestice (prečnik  $90 \pm 10 \mu\text{m}$ ) su rehidratirane u destilovanoj vodi i posle 48 h su dostigle svega 20 % inicijalne mase i 50 % inicijalne veličine vlažnih mikročestica (prečnik  $250 \pm 20 \mu\text{m}$ ) (slika 4.27).



**Slika 4.27.** Rehidracija suvih Ag/alginatnih mikročestica u destilovanoj vodi: A) vlažne mikročestice; B) suve mikročestice; C) suve mikročestice nakon 48 h rehidracije (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ )

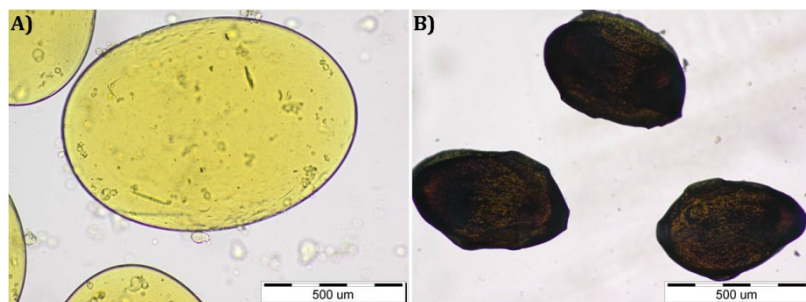
Prisustvo nanočestica srebra u Ag/alginatnim mikročesticama nakon rehidracije u destilovanoj vodi u toku 48 h je ispitano UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.28). Na osnovu apsorpcionog spektra i intenziteta maksimalne apsorbance na talasnoj dužini od  $\sim 410 \text{ nm}$  se jasno vidi prisustvo nanočestica u mikročesticama nakon sušenja i rehidracije u vodi, pri čemu se intenzitet maksimalne apsorbance smanjio za  $\sim 75 \%$  u odnosu na početne vlažne mikročestice.



**Slika 4.28.** Apsorpcioni spektri vlažnih i rehidratiranih Ag/alginatnih mikročestica u destilovanoj vodi u toku 48 h nakon rastvaranja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 19\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

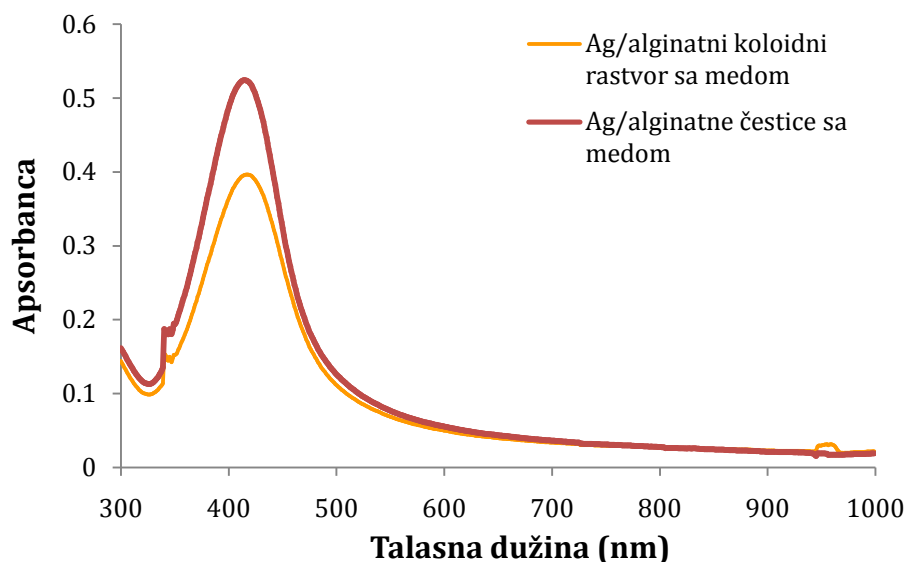
#### 4.2.3 DOBIJANJE Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA SA MEDOM

U ovom radu su razvijeni stabilni koloidni rastvori alginata sa nanočesticama srebra i medom (poglavlje 4.1.4) tako da je u sledećoj fazi ispitivana mogućnost dobijanja hidrogelova u obliku mikročestica iz ovih rastvora. Čestice sa inkorporisanim nanočesticama srebra i medom su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 10 mas.% meda u rastvor za geliranje. Dobijene čestice su bile elipsoidnog oblika veće ose  $1003 \pm 182 \mu\text{m}$  i manje ose  $680 \pm 90 \mu\text{m}$ , (slika 4.29A). Deo mikročestica je sušen do konstantne mase tako da su dobijene suve mikročestice veće ose  $550 \pm 110 \mu\text{m}$  i manje ose  $320 \pm 60 \mu\text{m}$  (slika 4.29B).



**Slika 4.29.** Ag/alginatne čestice sa medom dobijene elektrostatičkom ekstruzijom 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 10 mas.% meda: A) vlažne čestice; B) suve čestice (razmernik: 500 µm)

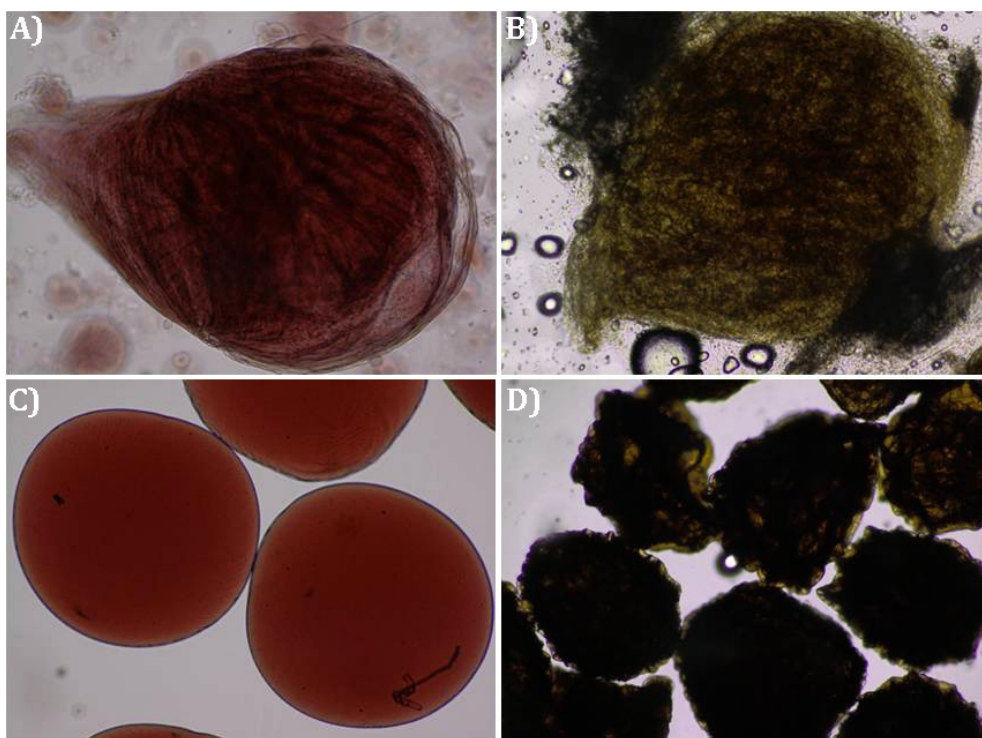
Prisustvo nanočestica srebra u Ag/alginatnim česticama sa medom je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.30). Na osnovu apsorpcionog spektra i nepromenjenog položaja pika u odnosu na Ag/alginatni koloidni rastvor sa medom (oko 415 nm) jasno se može zaključiti da med ne utiče na nanočestice srebra unutar čestica. Ovaj rezultat je i očekivan jer je prethodno pokazano da dodavanje meda u Ag/alginatni koloidni rastvor dovodi do dodatne stabilizacije nanočestica srebra (poglavlje 4.1.4).



**Slika 4.30.** Apsorpcioni spektri 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 10 mas.% meda i čestica dobijenih ekstruzijom 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 10 mas.% meda nakon rastvaranja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

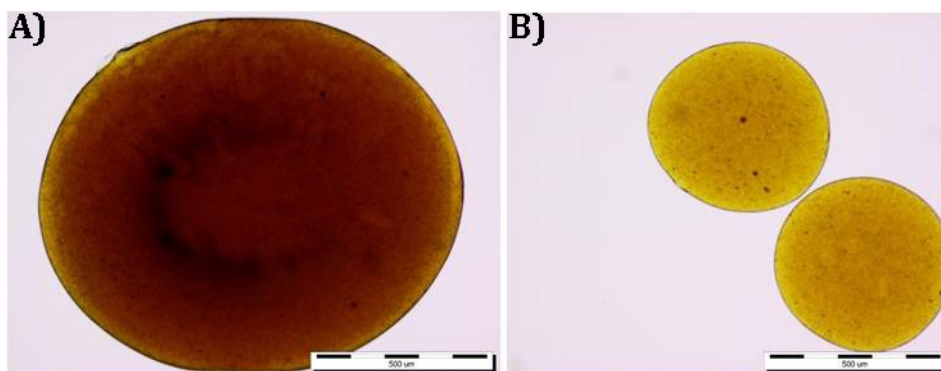
#### 4.2.4 DOBIJANJE PVA/Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA

Mogućnost dobijanja PVA/Ag/alginatnih nanokompozitnih mikročestica je ispitivana primenom elektrostatičke ekstruzije praćene ciklusima zamrzavanja-odmrzavanja. Koncentracije PVA, alginata i nanočestica srebra u koloidnom rastvoru su bile 5,6 mas.%, 1,26 mas.% i 2,6 mM, redom, dok je kao kontrola korišćen Ag/alginatni koloidni rastvor koncentracije alginata od 1,26 mas.% i nanočestica srebra od 2,6 mM. Kada je primenjeni napon iznosio 7 kV, a rastojanje između naelektrisane igle i rastvora za geliranje iznosilo 2,5 cm, dobijene su izdužene PVA/Ag/alginatne čestice prečnika  $940 \pm 60 \mu\text{m}$  (slika 4.31A), dok su kontrolne Ag/alginatne čestice bile uniformne i sferične prečnika  $720 \pm 20 \mu\text{m}$  (slika 4.31C). Nakon 4 ciklusa odmrzavanja-zamrzavanja nije došlo do promene veličine PVA/Ag/alginatnih čestica (prečnik je iznosio  $950 \pm 130 \mu\text{m}$ , slika 4.31B). Međutim, kontrolne Ag/alginatne čestice su se značajno smanjile i deformisale tako da je njihov prečnik iznosio  $490 \pm 60 \mu\text{m}$  (slika 4.31D).



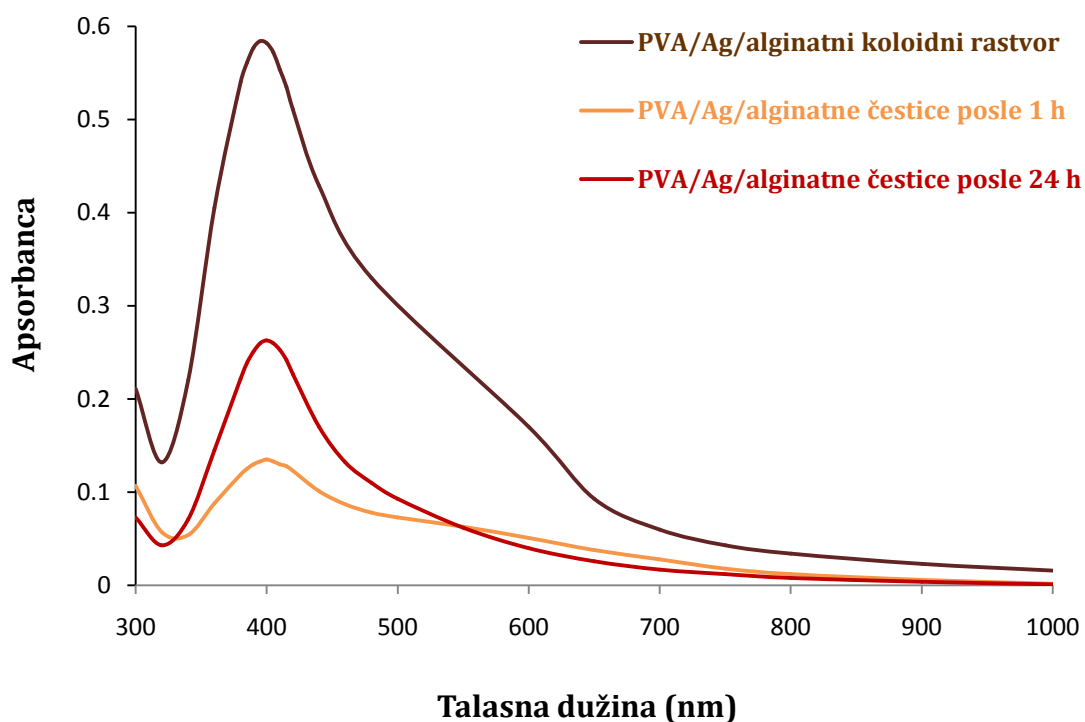
**Slika 4.31.** Nanokompozitne PVA/Ag/alginatne (A, B) i kontrolne Ag/alginatne mikročestice (C, D) pre (A,C) i posle četiri ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja (B, D) (razmernik:  $500 \mu\text{m}$ )

Radi dobijanja sferičnih PVA/Ag/alginatnih mikročestica povećano je rastojanje između elektroda na 8 cm i primenjeni su naponi od 7 i 8 kV. Čestice dobijene pri naponu od 7 kV su bile relativno sferične i prečnika  $1270 \pm 140 \mu\text{m}$  (slika 4.32A). Kada je napon povećan na 8 kV došlo je do bimodalne raspodele veličina mikročestica tako da su dobijene dve grupe sferičnih mikročestica prečnika  $520 \pm 10 \mu\text{m}$  i  $170 \pm 10 \mu\text{m}$  (slika 4.32B).



**Slika 4.32.** PVA/Ag/alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom pre zamrzavanja pri rastojanju između elektroda od 8 cm i pri naponu od: A) 7 kV; B) 8 kV (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ )

Prisustvo nanočestica srebra u PVA/Ag/alginatnim česticama je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom nakon rastvaranja čestica (prečnik  $960 \pm 130 \mu\text{m}$ ) u rastvoru Na-citratu posle 1 h i posle 24 h (slika 4.33). Dobijeni rezultati ukazuju da čestice zadržavaju maksimalni intenzitet apsorbanse na talasnoj dužini u opsegu 400-410 nm. Takođe se na slici 4.33 može uočiti da vrednost intenziteta apsorbanse raste sa vremenom rastvaranja što ukazuje na postepeno rastvaranje alginata. Ipak, maksimalna vrednost apsorbanse ( $0,263 \pm 0,007$ ) posle 24 h rastvaranja nije dostigla vrednost od  $0,584 \pm 0,01$  koju je imao inicijalni PVA/Ag/alginatni koloidni rastvor. Ovaj rezultat ukazuje da je jedan deo nanočestica ostao u hidrogelu PVA koji se ne rastvara u Na-citratu.

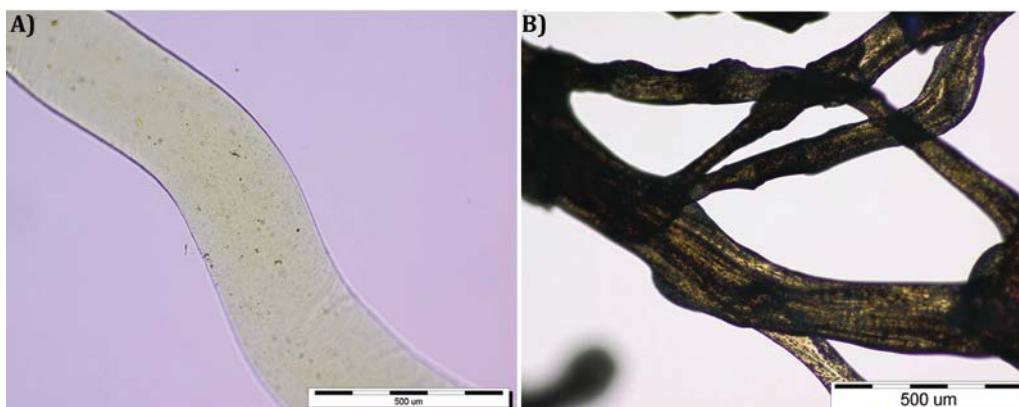


**Slika 4.33.** Apsorpcioni spektri PVA/Ag/alginatnog koloidnog rastvora i PVA/Ag/alginatnih čestica nakon rastvaranja u Na-citratu u toku 1 h i 24 h (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

#### 4.2.5 DOBIJANJE Ag/ALGINATNIH MIKROVLAKANA

Ag/alginatna mikrovlakna su pravljena u dve eksperimentalne serije i korišćena su u *in vivo* ispitivanjima.

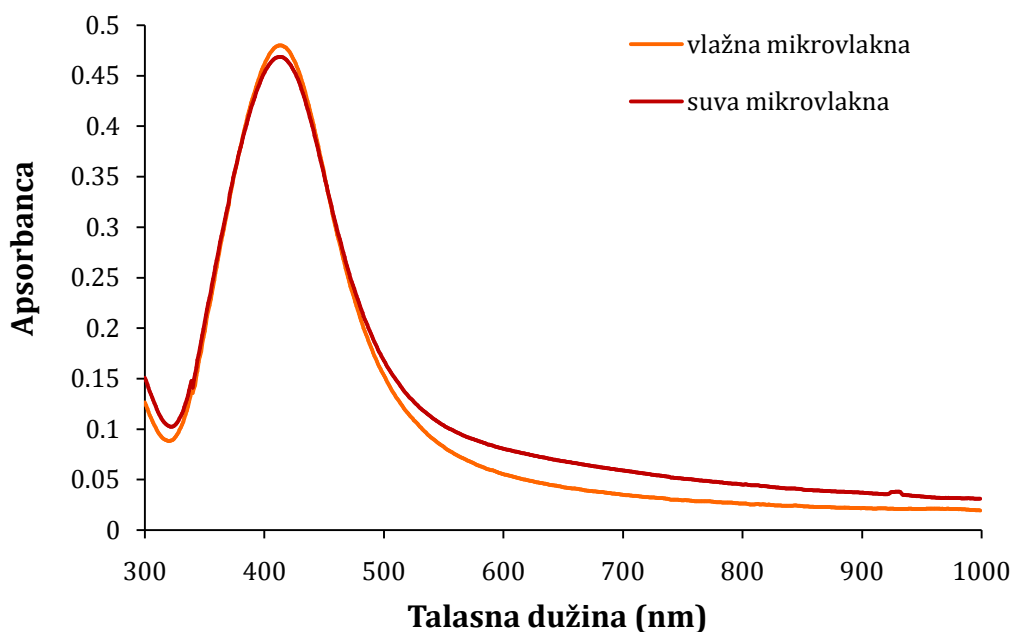
U prvoj eksperimentalnoj seriji Ag/alginatna mikrovlakna (prečnik  $310 \pm 40 \mu\text{m}$ , slika 4.34A) su dobijena ekstruzijom 1,4 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora bez istezanja kako je opisano u odeljku 3.7. Deo mikrovlakana je sušen do konstantne mase tako da su dobijena suva mikrovlakna prečnika  $100 \pm 30 \mu\text{m}$  (slika 4.34B) sa oko 4,4 % početne mase vlažnih mikrovlakana.



**Slika 4.34.** Ag/alginatna mikrovlakna u prvoj eksperimentalnoj seriji: A) vlažna; B) suva (razmernik: 500 µm)

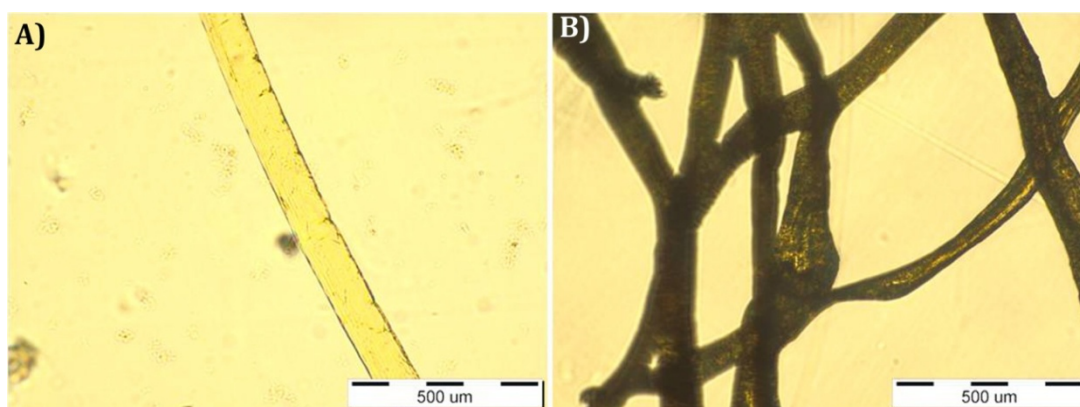
Prisustvo nanočestica srebra u vlažnim i suvim mikrovlaknima je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.35), gde su dobijeni gotovo identični spektri sa maksimalnom apsorbancom na talasnoj dužini od ~410 nm. Jednake vrednosti intenziteta maksimalne apsorbanice ukazuju da su nanočestice očuvane u celosti tokom sušenja. Koncentracije ukupnog srebra određene primenom AAS u vlažnim i suvim mikrovlaknima su iznosile  $1,5 \pm 0,3$  mM i  $1,6 \pm 0,5$  mM, redom. Vlažna i suva mikrovlakna dobijena u ovoj eksperimentalnoj seriji su primenjena u ispitivanju zarastanja rana na modelu opekotina II stepena kod pacova (poglavlje 4.4.1.2).





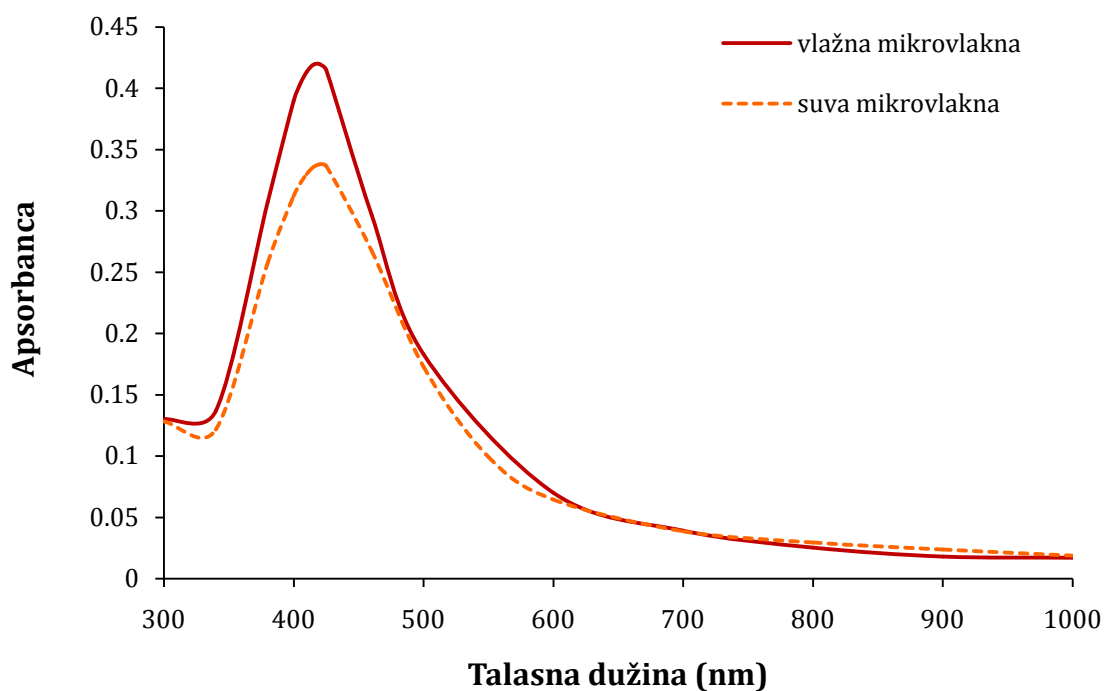
**Slika 4.35.** Apsorpcioni spektri vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana u prvoj eksperimentalnoj seriji (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

U drugoj eksperimentalnoj seriji ekstruzijom 0,7 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa istežanjem dobijena su Ag/alginatna mikrovlakana prečnika  $120 \pm 20 \mu\text{m}$  (slika 4.36A) su dobijena kako je opisano u odeljku 3.7. Sušenjem vlažnih Ag/alginatnih mikrovlakana na sobnoj temperaturi do konstantne mase dobijena su suva Ag/alginatna mikrovlakana prečnika  $80 \pm 10 \mu\text{m}$  (slika 4.36B), sa oko 5,45 % inicijalne mase vlažnih mikrovlakana.



**Slika 4.36.** Ag/alginatna mikrovlakana dobijena u drugoj eksperimentalnoj seriji: A) vlažna; B) suva (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ )

Prisustvo nanočestica srebra i u ovim vlažnim i suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.37). U ovom slučaju je dobijeno nešto lošije slaganje apsorpcionih spektara nego u prvoj eksperimentalnoj seriji. Maksimalne apsorbance su i ovde izmerene na talasnoj dužini od  $\sim 410$  nm, što ukazuje na prisustvo nanočestica srebra. Međutim, vrednost maksimalne apsorbance kod suvih mikrovlakana je za oko 20 % manja nego vrednost kod vlažnih mikrovlakana što ukazuje da je jedan deo nanočestica agregirao. Određivanjem ukupne koncentracije srebra u vlažnim i suvim mikrovlaknima primenom AAS dobijene su vrednosti od  $0,77 \pm 0,16$  mM i  $0,6 \pm 0,01$  mM, redom što ukazuje na nešto manju koncentraciju srebra u suvim mikrovlaknima iako u opsegu standardne devijacije. Obzirom da su suva mikrovlakna dobijena sušenjem vlažnih, dobijene manje koncentracije nanočestica i ukupnog srebra mogu se objasniti eksperimentalnom greškom ili većim varijacijama koncentracije nanočestica srebra u Ag/alginatnim mikrovlaknima dobijenim istezanjem tako da je sušen deo mikrovlakana sa verovatno manjom koncentracijom srebra. Dobijena vlažna i suva mikrovlakna u ovoj seriji su korišćena u ispitivanju zarastanja rana na modelu nekroze kod pacova (poglavlje 4.4.3.1)

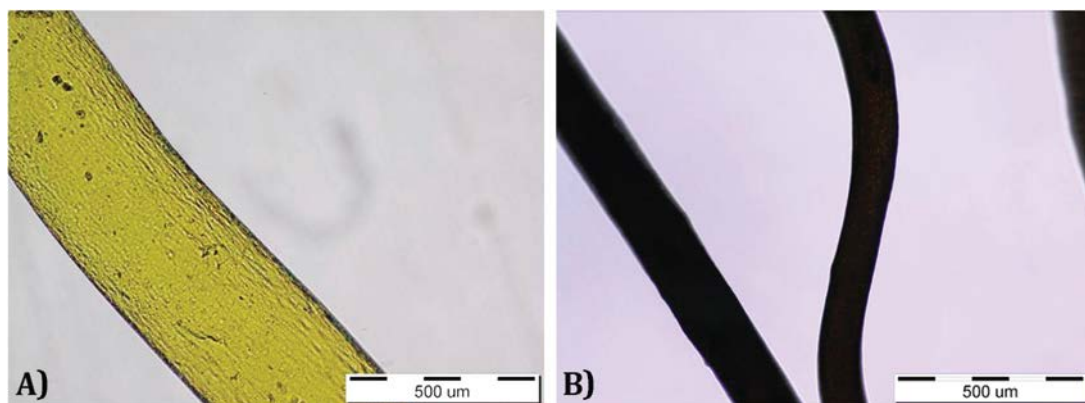


**Slika 4.37.** Apsorpcioni spektri vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana u drugoj eksperimentalnoj seriji (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

#### 4.2.6 DOBIJANJE Ag/ALGINATNA MIKROVLAKNA SA MEDOM

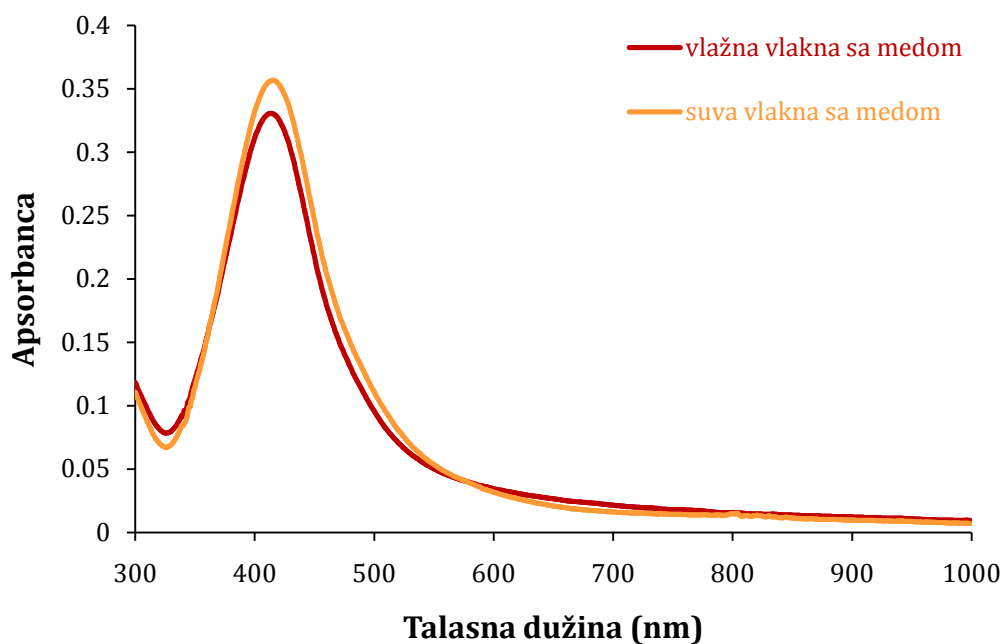
U ovom radu ispitivana je i mogućnost dobijanja hidrogelova u obliku mikrovlakana iz koloidnih rastvora alginata sa nanočesticama srebra i medom. Ag/alginatna mikrovlakna sa medom su pravljena u dve eksperimentalne serije i korišćena su u *in vivo* ispitivanjima.

U prvoj eksperimentalnoj seriji Ag/alginatna mikrovlakana sa medom su dobijena ekstruzijom 0,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 50 mas.% meda bez istežanja na način opisan u odeljku 3.7. Dobijena mikrovlakna su bila prečnika  $400 \pm 40 \mu\text{m}$  (slika 4.38A) i deo vlakana je zatim sušen do konstantne mase. Suva mikrovlakna su bila prečnika  $100 \pm 20 \mu\text{m}$  (slika 4.38B), a masa je iznosila oko 8,6 % inicijalne mase vlažnih mikrovlakana.



**Slika 4.38.** Ag/alginatna mikrovlakna sa medom dobijena u prvoj eksperimentalnoj seriji: A) vlažna mikrovlakna; B) suva mikrovlakna (razmernik: 500 µm)

Prisustvo nanočestica srebra u vlažnim i suvim mikrovlaknima je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.39), gde su dobijeni gotovo identični spektri sa maksimalnim intenzitetom apsorbanice na talasnoj dužini od oko 410 nm. Takođe, jednaki intenziteti maksimalne apsorbanice u okviru standardne devijacije ukazuju na očuvanje nanočestica srebra u suvim mikrovlaknima. Primenom AAS određene su koncentracije ukupnog srebra koje su iznosile  $1,03 \pm 0,15$  mM i  $1,2 \pm 0,1$  mM u vlažnim i suvim mikrovlaknima, redom.

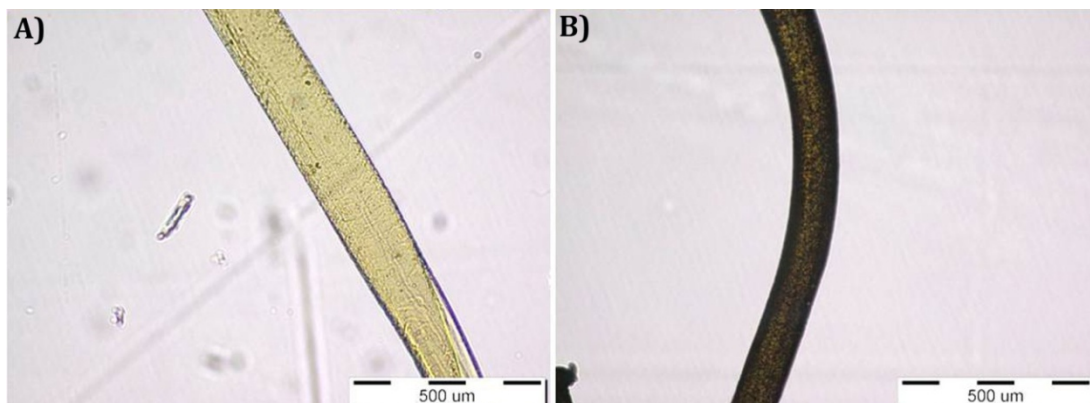


**Slika 4.39.** Apsorpcioni spektri vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom u prvoj eksperimentalnoj seriji (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)

Različiti izgled vlakana sa medom u odnosu na Ag/alginatna mikrovlakna ukazuje da su određene komponente meda zadržane unutar vlakana iako je jedan deo posebno malih molekula šećera otpušten u toku geliranja.

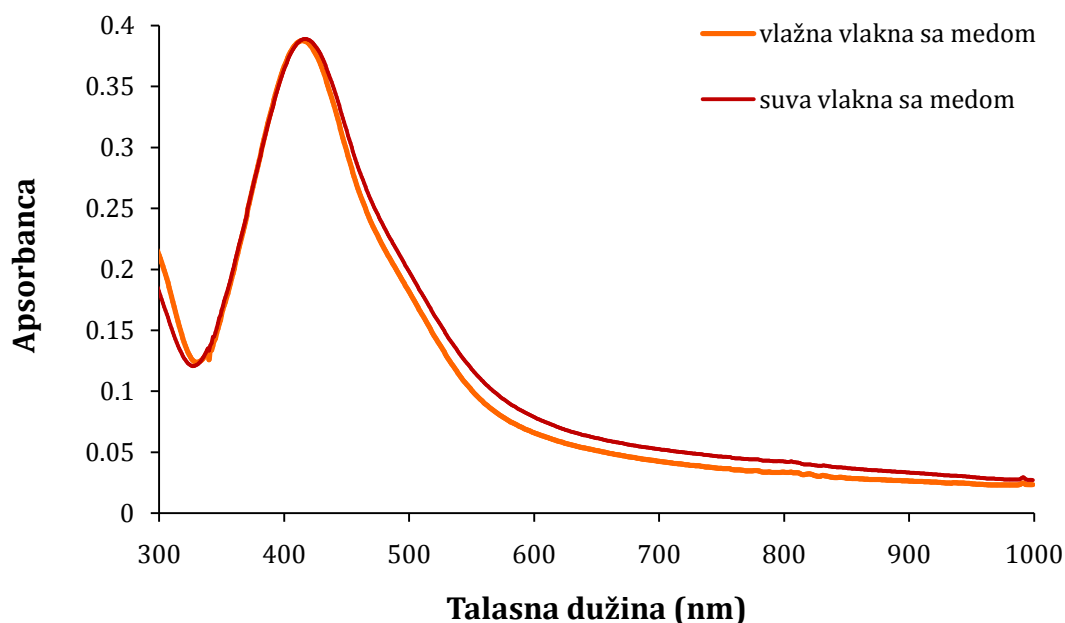
Vlažna i suva mikrovlakna sa medom dobijena u prvoj eksperimentalnoj seriji su korišćena u *in vivo* studiji zarastanja rana na modelu opekotina II stepena kod miševa (poglavlje 4.4.2).

U drugoj eksperimentalnoj seriji Ag/alginatna mikrovlakana sa medom su dobijena ekstruzijom 0,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 50 mas.% meda uz istezanje kao što je opisano u odeljku 3.7. Dobijena mikrovlakna su bila prečnika  $170 \pm 20 \mu\text{m}$  (slika 4.40A) i deo mikrovlakana je zatim sušen do konstantne mase. Suva Ag/alginatna mikrovlakna su bila prečnika,  $80 \pm 10 \mu\text{m}$  (slika 4.40B), a masa je iznosila  $\sim 9,7\%$  inicijalne mase vlažnih mikrovlakana.



**Slika 4.40.** Ag/alginatna mikrovlakna sa medom dobijena u drugoj eksperimentalnoj seriji: A) vlažna mikrovlakna; B) suva mikrovlakna (razmernik: 500 μm)

Prisustvo nanočestica srebra u vlažnim i suvim mikrovlaknima je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.41), gde su dobijeni gotovo identični spektri sa maksimalnim intenzitetom apsorbance na talasnoj dužini od ~410 nm. Takođe, jednaki intenziteti maksimalne apsorbance u okviru standardne devijacije ukazuju na očuvanje nanočestica srebra u suvim mikrovlaknima. Primenom AAS određene su koncentracije ukupnog srebra u vlažnim i suvim mikrovlaknima koje se statistički nisu značajno razlikovale, i srednja vrednost je iznosila  $1,26 \pm 0,08$  mM.



**Slika 4.41.** Apsorpcioni spektri vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom dobijenih u drugoj eksperimentalnoj seriji (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)

Ova mikrovlakna su korišćena u *in vivo* studiji zarastanja rana na modelu nekroze kod pacova.

#### 4.3 IN VITRO KARAKTERISANJE NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA

##### 4.3.1 ISPITIVANJE MEHANIČKIH KARAKTERISTIKA NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA NA BAZI ALGINATA I NANOČESTICA SREBRA

Mehaničke karakteristike nanokompozitnih hidrogelova različitih oblika (diskovi i pakovani sloj mikročestica) su ispitivane u biomimičnom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom koji imitira *in vivo* uslove u artikulanoj hrskavici. Ispitivanja su izvedena pri deformaciji od 10 % pri dva režima rada bioreaktora: i) pri dinamičkoj kompresiji, pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$ , i ii) pri stepenastom povećanju deformacije za 50  $\mu\text{m}$ , odnosno 75  $\mu\text{m}$  svakih 30 min (odeljak 3.9). Na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti odziva senzora opterećenja izračunate su vrednosti napona.

#### 4.3.1.1 ISPITIVANJE MEHANIČKIH KARAKTERISTIKA PAKOVANOG SLOJA Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA

Ag/alginate mikročestice sa različitim koncentracijama nanočestica srebra, dobijene su elektrostatičkom ekstruzijom Ag/alginate koloidnih rastvora sa koncentracijom alginata od 1,9 mas.% i koncentracijom nanočestica srebra od 1,5 mM, 2 mM i 3,9 mM. Kao kontrolne mikročestice su služile 1,9 mas.% alginate mikročestice. Parametri elektrostatičke ekstruzije su podešeni da bi se dobile sferične mikročestice i uniformne veličine od oko 600  $\mu\text{m}$  (tabela 4.1).

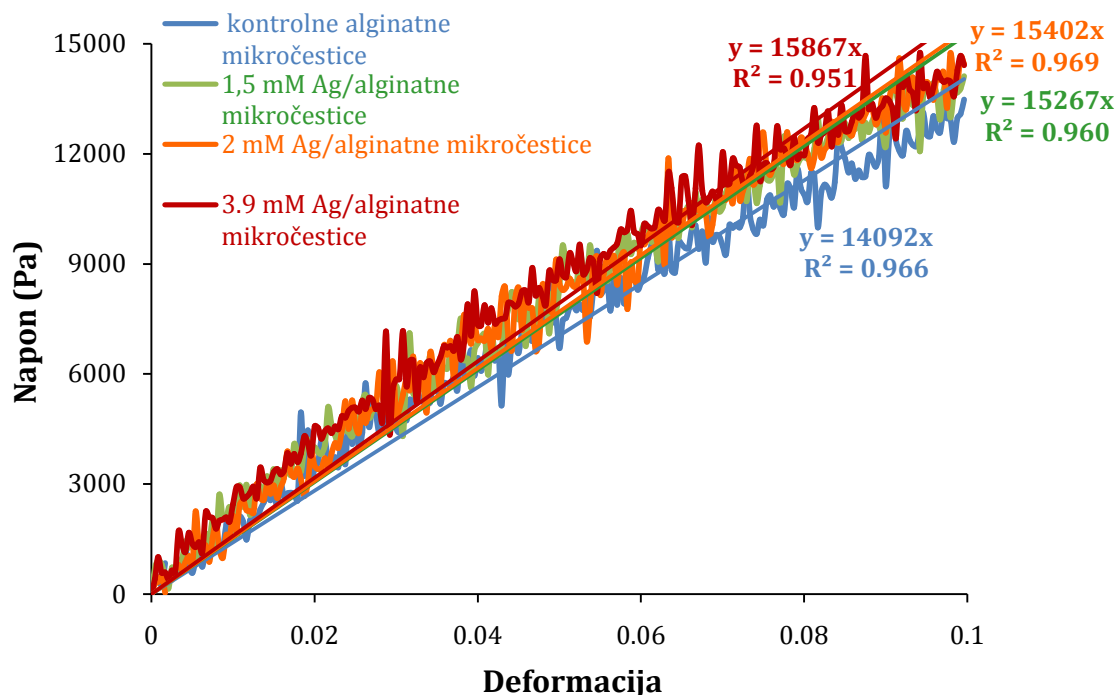
**Tabela 4.1.** Veličina Ag/alginate mikročestica dobijenih iz koloidnih rastvora alginata sa različitim koncentracijama nanočestica srebra

Koncentracija nanočestica srebra u Ag/alginate koloidnom rastvoru (mM)	0	1,5	2	3,9
Prečnik mikročestica ( $\mu\text{m}$ )	$600 \pm 30$	$610 \pm 30$	$650 \pm 40$	$550 \pm 20$

U posebnim eksperimentalnim serijama ispitivani su pakovani slojevi mikročestica visine 3 mm u po tri bioreaktorske komore istovremeno.

U cilju određivanja dinamičkog modula elastičnosti, pakovani sloj je testiran pri deformaciji od 10 % pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  i frekvenciji od 0,56 Hz. Dobijene zavisnosti napona od deformacije za pakovane slojeve Ag/alginate mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra su prikazane na slici 4.42. Može se uočiti približno linearni trend zavisnosti napona od deformacije u svim ispitivanim slučajevima ( $r^2 > 0,95$ , slika 4.42).





**Slika 4.42.** Eksperimentalno određene vrednosti napona u zavisnosti od primenjene deformacije pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  u dinamičkom režimu za pakovane slojeve Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra i kontrolne Ca-alginatne mikročestice i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

Iz nagiba ovih zavisnosti određen je modul elastičnosti pri dinamičkoj kompresiji za pakovane slojeve svih ispitivanih Ag/alginatnih mikročestica (tabela 4.2).

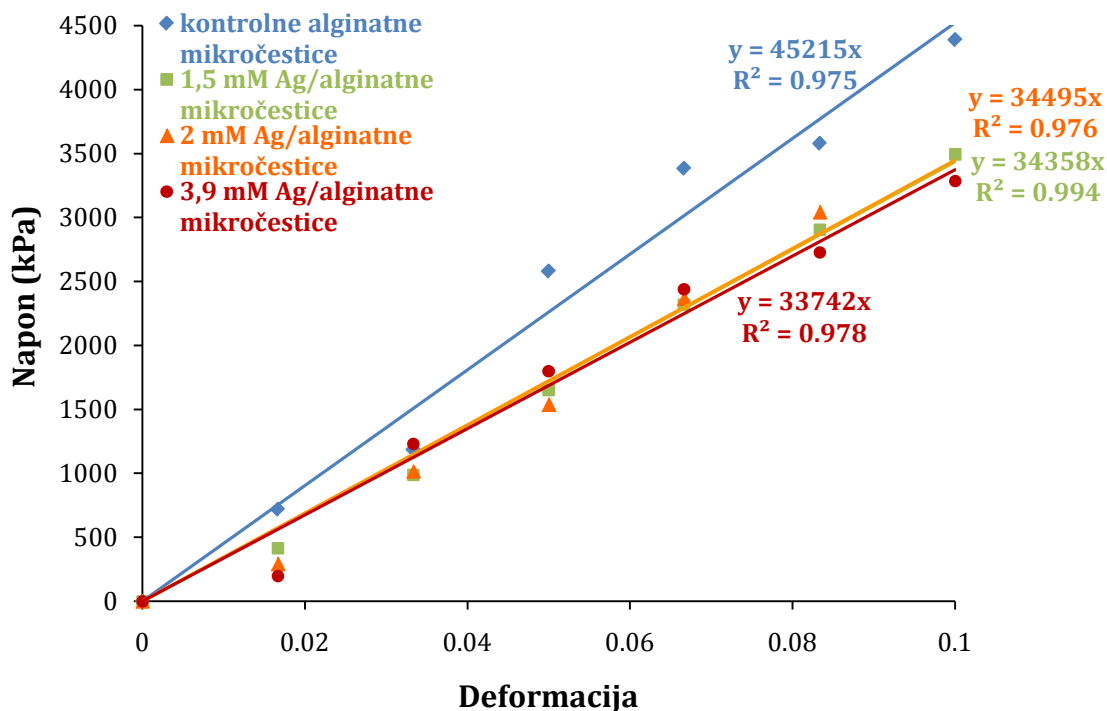
**Tabela 4.2.** Vrednosti dinamičkog modula elastičnosti pakovanih slojeva ispitivanih Ag/alginatnih mikročestica pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  i deformaciji od 10 %

Koncentracija nanočestica srebra u Ag/alginatnom koloidnom rastvoru (mM)	0	1,5	2	3,9
Dinamički modul elastičnosti mikročestica (kPa)	$141 \pm 2$	$153 \pm 6$	$154 \pm 5$	$159 \pm 5$

Može se uočiti da između dobijenih vrednosti dinamičkog modula elastičnosti pakovanih slojeva Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra nema značajne statističke razlike. Zbog toga se može usvojiti srednja vrednost dinamičkog modula elastičnosti za pakovani sloj Ag/alginatnih mikročestica od  $155 \pm 3$  kPa. Ova vrednost je nešto veća od vrednosti dinamičkog modula elastičnosti od  $141 \pm 2$  kPa određene za pakovani sloj kontrolnih alginatnih mikročestica (slika 4.42 i tabela 4.2). Na osnovu tog rezultata može se zaključiti da prisustvo nanočestica srebra u mikročesticama dovodi do blagog povećanja dinamičkog modula elastičnosti pakovanog sloja za oko 9 %.

U cilju određivanja ravnotežnog modula elastičnosti pakovanih slojeva ispitivanih Ag/alginatnih i kontrolnih mikročestica mereni su odzivi senzora pri stepenastom povećanju deformacije od 50  $\mu\text{m}$  pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  do deformacije od 10 % svakih 30 min.

Na slici 4.43 prikazane su eksperimentalne vrednosti napona od primenjene deformacije, kao i linearne zavisnosti dobijene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja. Može se uočiti dobro slaganje eksperimentalnih rezultata sa linearnom zavisnostima u svim ispitivanim slučajevima ( $r^2 > 0,976$ , slika 4.43).



**Slika 4.43.** Eksperimentalno određene vrednosti napona u zavisnosti od primenjene deformacije pri stepenastom povećanju deformacije od 50  $\mu\text{m}$  pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  svakih 30 min za pakovane slojeve Ag/alginatnih i kontrolnih mikročestica i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

Iz nagiba ovih zavisnosti određen je ravnotežni modul elastičnosti za pakovane slojeve svih ispitivanih Ag/alginatnih i kontrolnih mikročestica (tabela 4.3).

**Tabela 4.3.** Vrednosti ravnotežnih modula elastičnosti pakovanih slojeva ispitivanih Ag/alginatnih i kontrolnih mikročestica pri stepenastom povećanju deformacije od 50  $\mu\text{m}$  pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  do deformacije od 10 % svakih 30 min

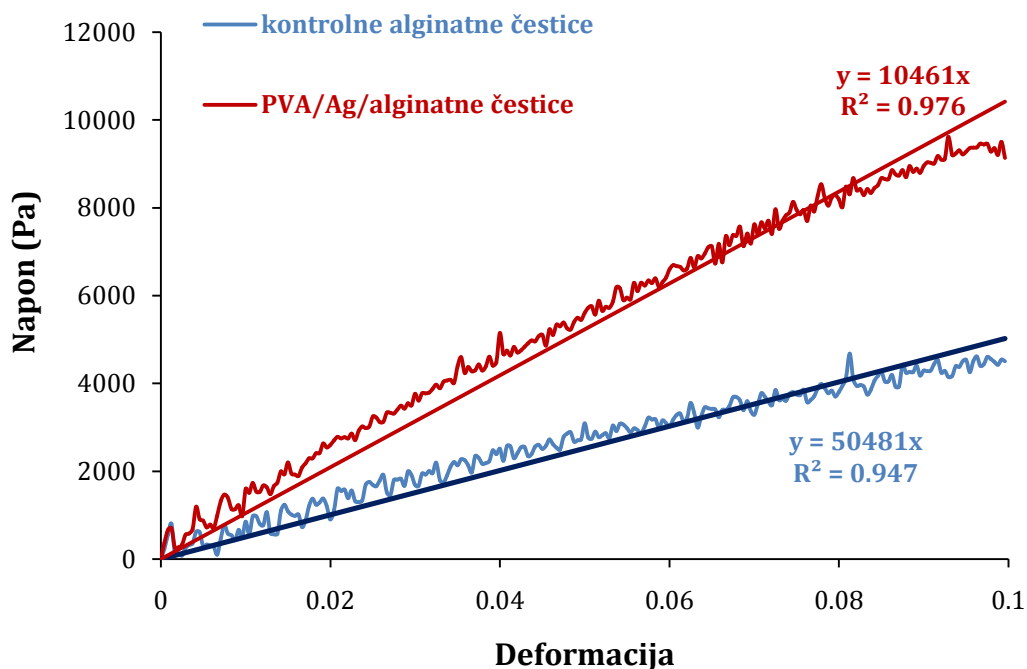
Koncentracija nanočestica srebra u Ag/alginatnom koloidnom rastvoru (mM)	0	1,5	2	3,9
Ravnotežni (Jangov) modul elastičnosti mikročestica (kPa)	45,2 $\pm$ 0,2	34,4	34,5	33,7

Može se uočiti da između dobijenih vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti pakovanih slojeva Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra nema značajne statističke razlike. Zbog toga se može usvojiti srednja vrednost ravnotežnog modula elastičnosti za sve pakovane slojeve Ag/alginatnih mikročestica od  $34 \pm 0,4$  kPa. Ova vrednost je nešto manja od vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti od  $45,2 \pm 0,2$  kPa određene za pakovani sloj kontrolnih alginatnih mikročestica (slika 4.43 i tabela 4.3). Na osnovu dobijenih vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti za pakovani sloj alginatnih mikročestica sa i bez nanočestica srebra može se zaključiti da prisustvo nanočestica smanjuje vrednost ravnotežnog modula elastičnosti za oko 25 %.

#### 4.3.1.2 ISPITIVANJE MEHANIČKIH KARAKTERISTIKA PAKOVANOG SLOJA PVA/Ag/ALGINATNIH ČESTICA

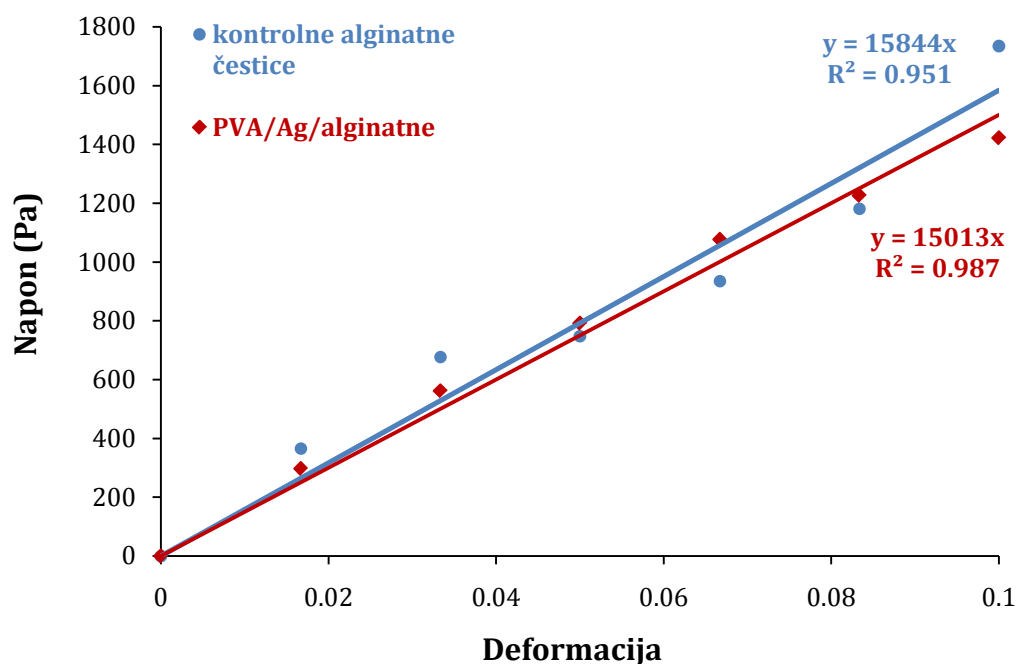
Da bi se ispitala mogućnost poboljšanja mehaničkih karakteristika alginatnih mikročestica dobijene su i testirane PVA/Ag/alginatne čestice prečnika  $1270 \pm 140$   $\mu\text{m}$  sa koncentracijama PVA od 5,6 mas.%, nanočestica srebra od 2,7 mM i alginata od 1,3 mas.%, dok su kao kontrola služile alginatne čestice prečnika  $1250 \pm 80$   $\mu\text{m}$  sa koncentracijom alginata od 1,3 mas.%.

Pakovani slojevi PVA/Ag/alginatnih i alginatnih čestica su bili visine 3 mm i ispitivani su u po 3 bioreaktorske komore istovremeno pri deformaciji od 10 % pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  i frekvenciji od 0,56 Hz. Približno linearne zavisnosti napona od primenjene deformacije su dobijene u oba slučaja. Na slici 4.44 prikazane su zavisnosti napona od deformacije u dinamičkom režimu kompresije iz kojih se uočava poboljšanje mehaničkih karakteristika sa dodatim komponentama alginatnom hidrogelu. Iz nagiba ovih zavisnosti određeni su moduli elastičnosti pri dinamičkoj kompresiji za pakovane slojeve alginatnih i PVA/Ag/alginatnih čestice od  $51 \pm 2$  kPa i  $105 \pm 7$  kPa, redom (slika 4.44).



**Slika 4.44.** Eksperimentalno određene zavisnosti napona od primenjene deformacije za pakovane slojeve PVA/Ag/alginatnih i kontrolnih alginatnih čestica pri deformaciji od 10 % brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  i frekvenciji od 0,56 Hz i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja)

U drugoj eksperimentalnoj seriji određeni su ravnotežni moduli elastičnosti pakovanih slojeva PVA/Ag/alginatnih i kontrolnih alginatnih čestica pri stepenastom povećanju deformacije za 50  $\mu\text{m}$  do deformacije od 10 % pri brzini od 337,5  $\mu\text{m/s}$  svakih 30 min. Približno linearne zavisnosti napona od primenjene deformacije su dobijene u oba slučaja. Na slici 4.45 prikazane su zavisnosti napona od deformacije u ravnotežnom režimu rada i iz nagiba ovih zavisnosti određeni su ravnotežni moduli elastičnosti za pakovane slojeve alginatnih i PVA/Ag/alginatnih čestica od 15,8 kPa i 15 kPa, redom (slika 4.45).



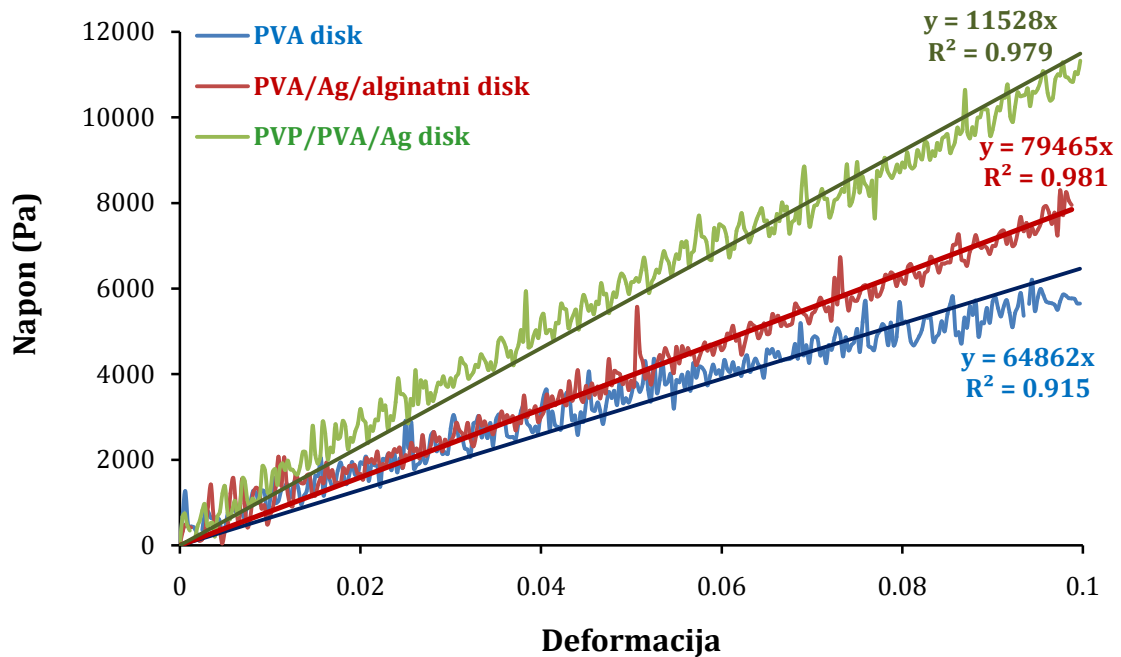
**Slika 4.45.** Eksperimentalno određene zavisnosti napona od primenjene deformacije za pakovane slojeve PVA/Ag/alginatnih i alginatnih čestica pri stepenastom povećanju deformacije za 50  $\mu\text{m}$  svakih 30 min i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja)

Na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti ravnotežnih modula elastičnosti može se zaključiti da nema značajne statističke razlike između vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti za pakovani sloj PVA/Ag/alginatnih i alginatnih čestica. S druge strane dinamički modul elastičnosti za pakovani sloj PVA/Ag/alginatnih čestica je značajno veći (~2 puta) od dinamičkom modula elastičnosti pakovanog sloja kontrolnih čestica. Dobijene razlike u modulima elastičnosti pri dinamičkoj kompresiji, a približno iste vrednosti ravnotežnih modula elastičnosti za pakovane slojeve PVA/Ag/alginatnih i alginatnih čestica, ukazuju na razlike u strukturi ovih hidrogelova koje dolaze do izražaja pri dinamičkom opterećenju. Uz to, treba naglasiti da pri velikoj brzini kompresije, voda koja se nalazi u porama hidrogela nema vremena da istekne, tako da utiče na modul elastičnosti pri dinamičkim uslovima (*Wang i sar., 2005*). Međutim, u slučaju kada postoji dovoljno vremena za relaksaciju polimerne mreže hidrogela i

ekvilibraciju sadržaja vode, razlike u mehaničkoj čvrstini između ispitivanih pakovanih slojeva čestica se gube.

#### 4.3.1.3 ISPITIVANJE MEHANIČKIH KARAKTERISTIKA PVA/Ag/ALGINATNIH I PVP/PVA/Ag ALGINATNIH DISKOVA

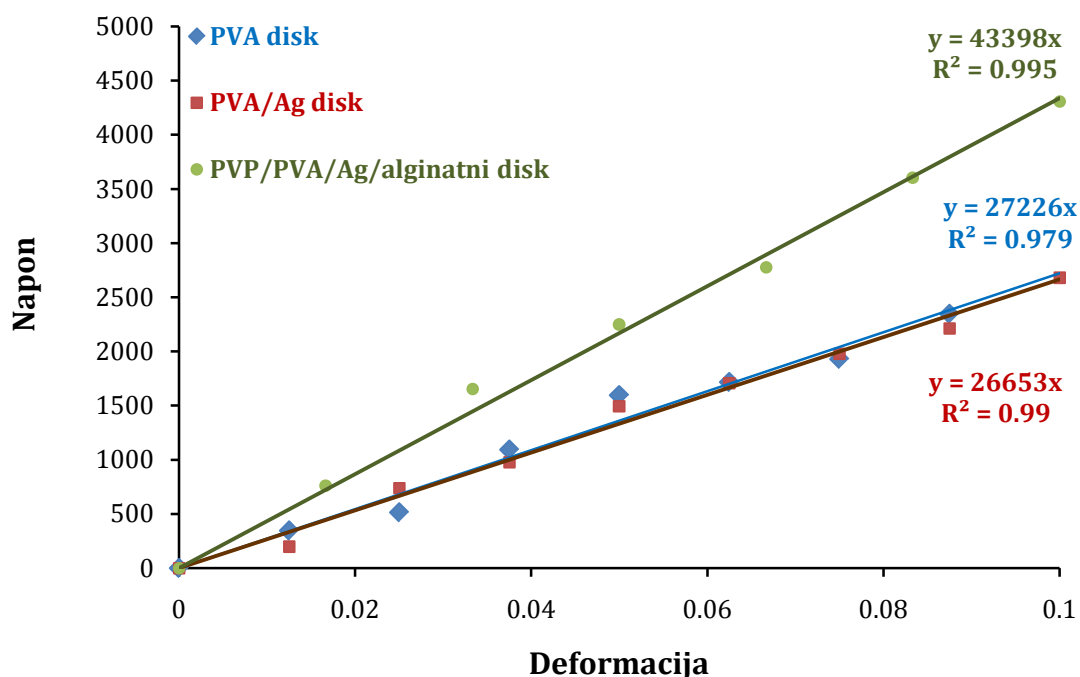
PVA/Ag/alginatni diskovi sa koncentracijama PVA od 5,6 mas.%, nanočestica srebra od 2,7 mM i alginata od 1,3 mas.% i kontrolni PVA diskovi sa koncentracijama PVA od 5,6 mas.% su testirani pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  do deformacije od 10 % u dinamičkom režimu pri frekvenciji od 0,42 Hz, kao i u ravnotežnom režimu pri stepenastom povećanju deformacije od 50  $\mu\text{m}$  svakih 30 min. PVP/PVA/Ag/alginatni diskovi sa koncentracijama PVP od 5 mas.%, PVA od 11 mas.%, nanočestica srebra od 0,8 mM i alginata od 0,4 mas.% su takođe testirani pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  do deformacije od 10 % u dinamičkom režimu pri frekvenciji od 0,38 Hz i ravnotežnom režimu pri stepenastom povećanju deformacije od 75  $\mu\text{m}$  uz pauze od po 30 min. Približno linearne zavisnosti napona od primenjene deformacije su dobijene u svim slučajevima. Na slici 4.46 prikazane su zavisnosti napona od deformacije u dinamičkom režimu kompresije iz kojih se uočava postepeno poboljšanje mehaničkih karakteristika sa dodatim komponentama u PVA hidrogela. Iz nagiba ovih zavisnosti određeni su moduli elastičnosti pri dinamičkoj kompresiji za PVA, PVA/Ag/alginatne i PVP/PVA/Ag/alginatne diskove od  $65 \pm 2$  kPa,  $79 \pm 1$  kPa i  $115 \pm 4$  kPa, redom (slika 4.46).



**Slika 4.46.** Eksperimentalno određene zavisnosti napona od primenjene deformacije za PVA, PVA/Ag/alginate i PVP/PVA/Ag/alginate diskove pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  u dinamičkom režimu i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

Na slici 4.47 prikazane su eksperimentalno određene vrednosti napona od deformacije u ravnotežnom režimu opterećenja za PVA, PVA/Ag/alginate i PVP/PVA/Ag/alginate diskove. Metodom najmanjih kvadratnih odstupanja određene su linearne zavisnosti ( $r^2 > 0,979$ ), pri čemu su iz nagiba određeni ravnotežni moduli elastičnosti za PVA, PVA/Ag/alginate i PVP/PVA/Ag/alginate diskove od 27,2 kPa, 26,7 kPa i 43 kPa, redom (slika 4.47).





**Slika 4.47.** Eksperimentalno određene zavisnosti napona od primenjene deformacije za PVA/Ag/alginate i PVA diskove pri stepenastom povećanju deformacije za 50  $\mu\text{m}$  svakih 30 min i PVP/PVA/Ag/alginate diskove pri stepenastom povećanju deformacije za 75  $\mu\text{m}$  svakih 30 min i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost od 3 merenja)

Na osnovu dobijenih vrednosti za PVA/Ag/alginate i PVA diskove može se uočiti da nema značajne statističke razlike između vrednosti ravnotežnih modula elastičnosti. S druge strane ravnotežni modul elastičnosti za PVP/PVA/Ag/alginate diskove je značajno veći što je u saglasnosti i sa najvećom vrednošću dinamičkog modula elastičnosti određenog za ove diskove (slika 4.46).

#### 4.3.2 ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA

Citotoksičnost Ag/alginate mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra je ispitana u tri eksperimentalna sistema: i) standardnim MTT testom citotoksičnosti u suspenziji humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi, ii) standardnim MTT testom citotoksičnosti na monosloju telećih hondrocita, i

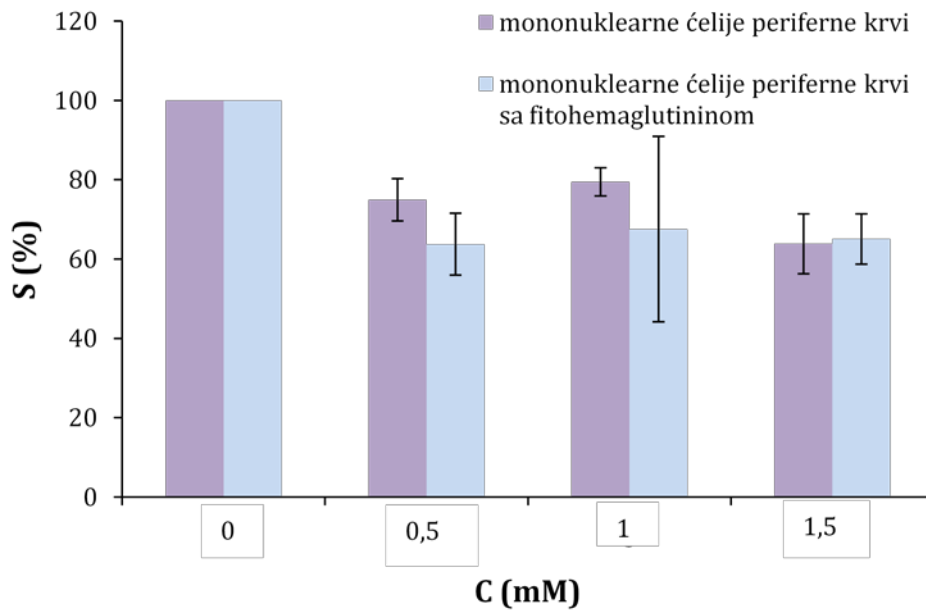
iii) u 3D kulturama telećih hondrocita imobilisanih u alginatne mikročestice u perfuzionom bioreaktoru.

#### 4.3.2.1 ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI U SUSPENZIJI HUMANIH MONONUKLEARNIH ĆELIJA PERIFERNE KRVI

Citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica je ispitivana u skladu sa standardnim protokolom, gde je kultura u suspenziji mononuklearnih ćelija periferne krvi u direktnom kontaktu sa ispitivanim materijalom, praćenjem vijabilnosti ćelija nakon 72 h pomoću MTT testa. Rađene su dve eksperimentalne serije. Pri čemu je kontrola bila suspenzija ćelija bez dodatka mikročestica.

U prvoj eksperimentalnoj seriji ispitivana je citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica dobijenih od 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM Ag/alginatnih koloidnih rastvora u suspenziji mononuklearnih ćelija periferne krvi. U drugoj eksperimentalnoj seriji je ispitivana citotoksičnost istih Ag/alginatnih mikročestica u suspenziji mononuklearnih ćelija periferne krvi sa dodatkom fitohemaglutinina, koji stimuliše ćelijsku proliferaciju, u koncentraciji od 5 µg/ml,.

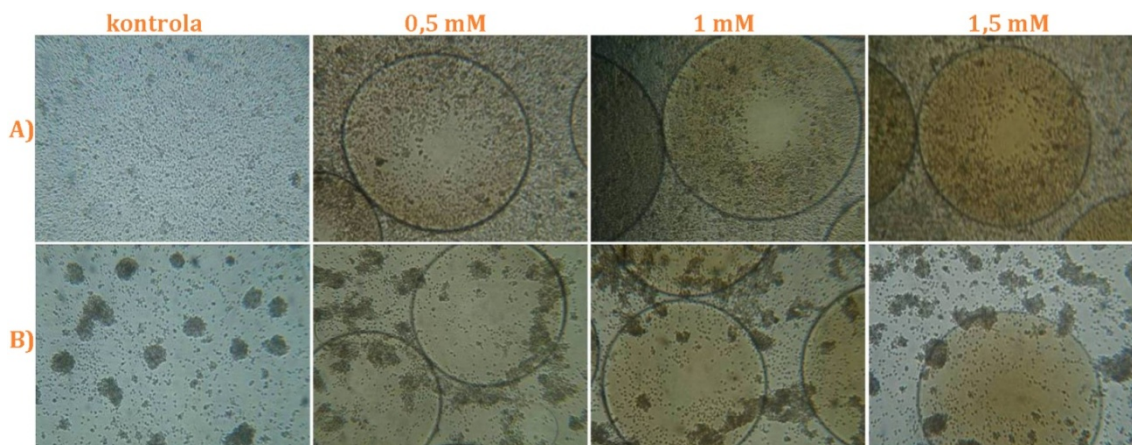
Na slici 4.48 su prikazani rezultati koji ukazuju da Ag/alginatne mikročestice dobijene od 0,5 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora smanjuju preživljavanje ćelija nestimulisanih i stimulisanih sa fitohemaglutininom za 25 % i 36 %, redom, u odnosu na kontrolu. Takođe, Ag/alginatne mikročestice dobijene od 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora smanjuju preživljavanje ćelija nestimulisanih i stimulisanih sa fitohemaglutininom za 20,5 % i 32,5 %, redom, u odnosu na kontrolu (slika 4.48), dok mikročestice dobijene od 1,5 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora smanjuju preživljavanje za 36 % i 35 % nestimulisanih i stimulisanih ćelija, redom u odnosu na kontrolu (slika 4.48).



**Slika 4.48.** Preživljavanje, S, kultura nestimuliranih mononuklearnih ćelija periferne krvi i stimuliranih sa dodatkom fitohemaglutinina u prisustvu Ag/alginatnih mikročestica dobijenih od Ag/alginatnih koloidnih rastvora sa različitim koncentracijama nanočestica srebra, C, sa standardnim devijacijama (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da nema statistički značajnih razlika u citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica dobijenih od 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM Ag/alginatnih koloidnih rastvora. Blagi citotoksični efekti su uočeni u svim slučajevima pri čemu su stimulirane ćelije bile nešto senzitivnije na prisustvo Ag/alginatnih mikročestica, ali razlike ni ovde nisu bile statistički značajne (slika 4.48).

Na slici 4.49 su prikazane mikrofotografije kontrolnih kultura i kultura ćelija periferne krvi nakon 72 h tretmana Ag/alginatnim mikročesticama sa različitim koncentracijama nanočestica srebra gde se jasno videti prisustvo ćelija u svim ispitivanim grupama. Istovremeno se može uočiti da nema vizuelnih razlika u gustini i izgledu prisustnih ćelija između kontrolne grupe i grupa tretiranih ispitivanim biomaterijalom. U tretiranim grupama se uočavaju i Ag/alginatne mikročestice sa žutim obojenjem.



**Slika 4.49.** Mikrofotografije kontrolnih kultura i kultura mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon 72 h tretmana Ag/alginatnim mikročesticama dobijenih od 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM Ag/alginatnih koloidnih rastvora: A) nestimulisane mononuklearne ćelije periferne krvi; B) stimulisane mononuklearne ćelije periferne krvi sa dodatkom fitohemaglutinina

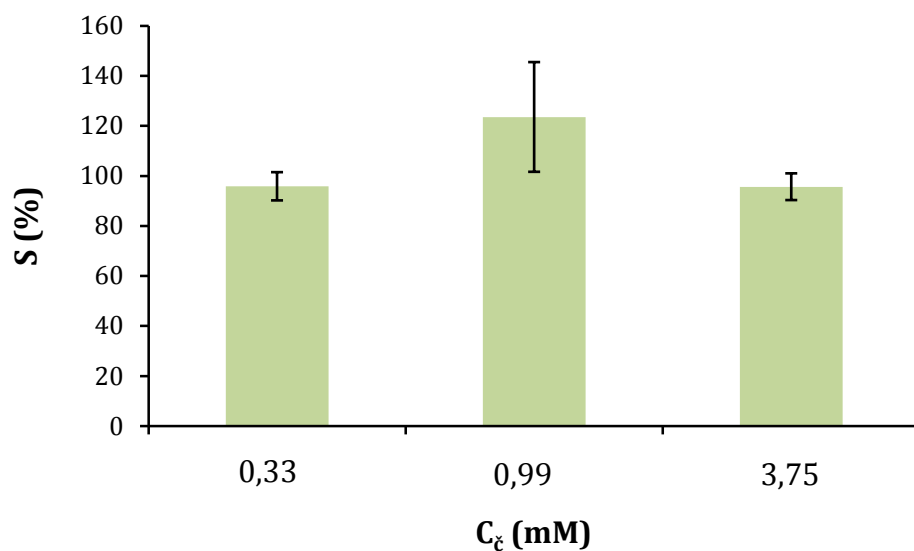
#### 4.3.2.2 ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI U MONOSLOJU TELEĆIH HONDROCITA

Citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica je ispitivana u skladu sa standardnim protokolom, gde je kultura monosloja telećih hondrocita u direktnom kontaktu sa ispitivanim materijalom, određivanjem vijabilnosti ćelija nakon 48 h pomoću MTT testa. U ovoj eksperimentalnoj studiji rađene su dve eksperimentalne serije, gde je masa mikročestica po bunariću iznosila 0,3 i 0,6 g u prvoj i drugoj eksperimentalnoj seriji, redom. Ispitivana je citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra u opsegu 0,33-3,76 mM. Takođe, izvedena je i odvojena studija pod istim uslovima uz korišćenje fiziološkog rastvora umesto ćelijske kulture da bi se odredila koncentracija otpuštenih nanočestica srebra i/ili jona kojoj su bile izložene ćelije u monosloju. Pri tome je u fiziološkom rastvoru određena koncentracija slobodnih jona srebra, kao i koncentracija ukupnog otpuštenog srebra nakon rastvaranja istaloženog srebro-hlorida.

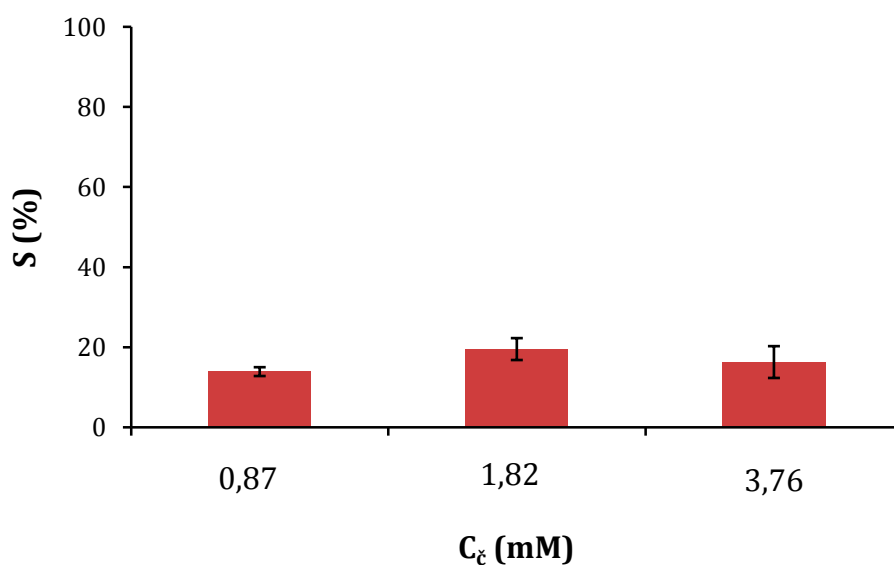
Efekti dodatka Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama srebra pri dve različite mase mikročestica po kulturi na preživljavanje telećih

hondrocita u monosloju su prikazani na slici 4.50. Pri tome je preživljavanje izraženo u odnosu na kontrolnu kulturu monosloja ćelija sa dodatkom Ca-alginatnih mikročestica.

A)



B)



**Slika 4.50.** Preživljavanje, S, telećih hondrocita u monosloju u odnosu na kontrolu, kultura monosloja ćelija sa dodatkom Ca-alginatnih mikročestica, pri dodatku Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica,  $C_{\xi}$ , različitih masa po bunaruću: A) 0,3 g; B) 0,6 g (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

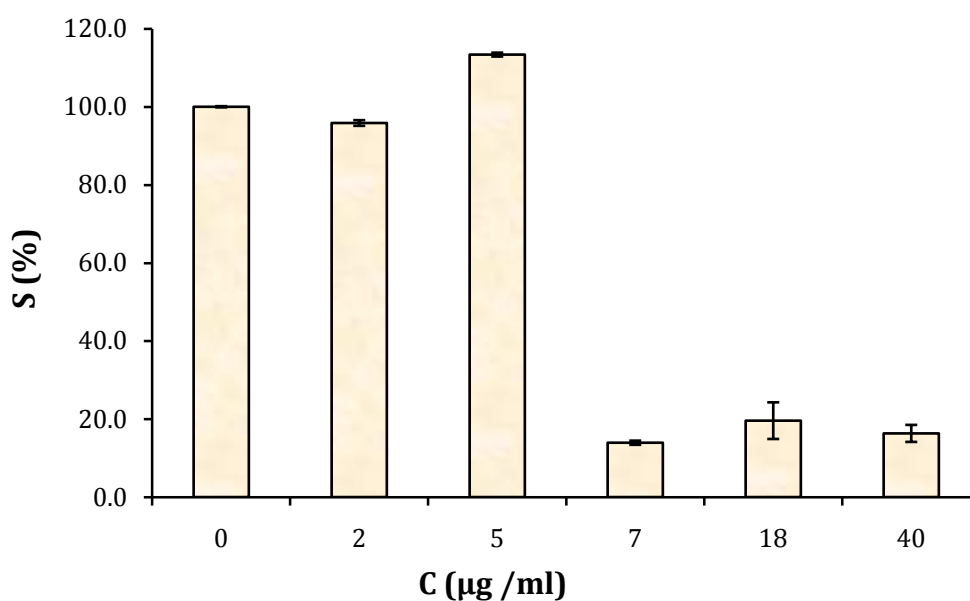
Može se uočiti da nema značajnih razlika u preživljavanju u odnosu na kontrolu u zavisnosti od koncentracije nanočestica srebra u Ag/alginatnim mikročesticama, već da je preživljavanje zavisilo samo od unete količine mikročestica. Masa mikročestica od 0,3 g po bunariću nije izazvala citotoksične efekte, dok je masa od 0,6 g izazvala jaku citotoksičnost. Kada je izmerena koncentracija otpuštenih slobodnih jona srebra u fiziološkom rastvoru u svim ispitivanim uzorcima dobijene su statistički jednake vrednosti tako da je koncentracija slobodnih jona srebra iznosila  $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ . Međutim, kada je totalna koncentracija srebra merena posle rastvaranja AgCl zapažena je značajna razlika između eksperimentalnih grupa, što je i bilo očekivano. U tabeli 4.4 sumirani su eksperimentalni uslovi određivanja citotoksičnosti i izmerene koncentracije ukupnog otpuštenog srebra u fiziološkom rastvoru.

**Tabela 4.4.** Otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru nakon 48 h

Koncentracija nanočestica srebra u mikročesticama (mM)	Masa mikročestica po bunariću (g)	Koncentracija ukupnog otpuštenog srebra u fiziološkom rastvoru ( $\mu\text{g/ml}$ )	Deo otpuštenog srebra u fiziološkom rastvoru * (%)
$0,33 \pm 0,02$	0,3	$2,0 \pm 0,2$	52
$0,99 \pm 0,07$	0,3	$5,0 \pm 0,7$	47
$3,75 \pm 0,04$	0,3	$22,9 \pm 0,5$	53
$0,87 \pm 0,05$	0,6	$6,8 \pm 0,5$	35
$1,82 \pm 0,05$	0,6	$17,6 \pm 4,7$	43
$3,76 \pm 0,02$	0,6	$40,0 \pm 2,2$	48

\*izračunato na osnovu srednje izmerene koncentracije srebra u fiziološkom rastvoru, zapremine rastvora, početne koncentracije srebra i mase Ag/alginatnih mikročestica

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da nakon 48 h Ag/alginate mikročestice otpuste 40-50 % ukupnog sadržaja srebra u inicijalnim mikročesticama u fiziološki rastvor dajući ukupnu koncentraciju srebra, u obliku jona srebra i srebro-hlorida u opsegu 2-40  $\mu\text{g/ml}$ . Efekat ovih koncentracija na preživljavanje ćelija u prisustvu alginatih i Ag/alginate mikročestica je prikazan na slici 4.51. Međutim, treba naglasiti da su izostavljeni rezultati za masu mikročestica od 0,3 g (koncentracija nanočestica srebra  $3,75 \pm 0,04 \text{ mM}$ ) po bunariću, jer je izmerena koncentracija otpuštenog srebra ( $22,9 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ ) značajno veća od očekivane, što se može objasniti eksperimentalnom greškom. Sada se sa slike jasno može videti da koncentracije otpuštenog srebra do 5  $\mu\text{g/ml}$  imaju zanemarljiv uticaj na preživljavanje telećih hondrocita ( $S > 90 \%$ ). Međutim, porast koncentracije otpuštenog srebra na 7  $\mu\text{g/ml}$  pokazuje jaku citotoksičnost ( $S = 13,9 \pm 0,8 \%$ ).



**Slika 4.51.** Preživljavanje,  $S$ , kulture telećih hondrocita u prisustvu alginatih i Ag/alginate mikročestica sa različitim koncentracijama normalizovana u odnosu na kontrolni uzorak sa Ca-alginatnim mikročesticama kao funkcija koncentracije ukupnog oslobođenog srebra u medijum,  $C$  (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja)

#### 4.3.2.3 ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI Ag/ALGINATNIH MIKROČESTICA U 3D ĆELIJSKOJ KULTURI U PERFUZIONOM BIOREAKTORU

U cilju utvrđivanja citotoksičnih efekata Ag/alginatnih mikročestica u uslovima koji imitiraju *in vivo* uslove, uspostavljena je 3D kultura hondrocita u perfuzionom bioreaktoru. Hondrociti izolovani iz teleće artikularne hrskavice su imobilisani u alginatne mikročestice u koncentraciji od  $(21,0 \pm 1,7) \times 10^6$  ćel/ml uz praktično 100 % očuvanje vijabilnosti. Alginatne mikročestice sa ćelijama prečnika  $770 \pm 30 \mu\text{m}$  su pomešane sa Ag/alginatnim mikročesticama sa koncentracijom nanočestica srebra od  $4,7 \pm 0,6 \text{ mM}$  i prečnika  $790 \pm 20 \mu\text{m}$  u masenom odnosu 3:1. Mikročestice su gajene u perfuzionom bioreaktoru pri konstantnoj perfuziji međujuma od 0,38 ml/min. Nakon 2 nedelje gajenja u bioreaktoru, mikročestice su bile blago deformisane, dok se koncentracija imobilisanih ćelija nije statistički značajno promenila i iznosila je  $(16,4 \pm 3,5) \times 10^6$  ćel/ml. Vijabilnost imobilisanih ćelija nakon rastvaranja alginata je iznosila oko 78 % što ukazuje na blag citotoksični efekat Ag/alginatnih mikročestica.

U cilju određivanja maksimalne koncentracije otpuštenih nanočestica i/ili jona srebra u medijumu kojoj su ćelije bile izložene u toku gajenja u bioreaktoru izveden je eksperiment pod istim uslovima kao bioreaktorskog gajenja s tim što su korišćene alginatne mikročestice (prečnik  $650 \pm 40 \mu\text{m}$ ) bez imobilisanih ćelija. Alginatne mikročestice su pomešane sa Ag/alginatnim mikročesticama sa koncentracijom nanočestica srebra od  $5,5 \pm 0,4 \text{ mM}$  u masenom odnosu 3:1 dok je u bioreaktorskom sistemu recirkulisao fiziološki rastvor protokom od 0,3 ml/min. Eksperiment je trajao 72 h što odgovara prvoj zameni medijuma u 3D ćelijskoj kulturi. Takođe, pretpostavlja se da je u tom trenutku najviša bila i koncentracija otpuštenog srebra kojoj su ćelije bile izložene u toku gajenja zbog očekivanog smanjenja brzine otpuštanja srebra iz mikročestica sa vremenom. Nakon 72 h izmerena je koncentracija slobodnih Ag jona u fiziološkom rastvoru i iznosila je  $0,9 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ . Obzirom na rezultate otpuštanja srebra dobijene u eksperimentu određivanja citotoksičnosti, može se pretpostaviti da je koncentracija ukupnog otpuštenog srebra zapravo značajno veća. Zato je određena ukupna količina



otpuštenih nanočestica i/ili jona srebra iz Ag/alginatnih mikročestica merenjem koncentracije srebra u inicijalnim mikročesticama i nakon 72 h perfuzije fiziološkog rastvora. Koncentracija srebra je iznosila  $5,5 \pm 0,4$  mM i  $102 \pm 16$   $\mu$ M u inicijalnim mikročesticama i u mikročesticama nakon 72 h u fiziološkom rastvoru, redom. Na osnovu mase Ag/alginatnih mikročestica u bioreaktoru (0,13 g) i zapremine fiziološkog rastvora, ukupna koncentracija otpuštenog srebra u fiziološkom rastvoru je izračunata kao  $9,3 \pm 0,9$   $\mu$ g/ml. Ova koncentracija srebra je dakle u perfuzionom bioreaktoru imala zanemarljivi efekat na ćelijsku vijabilnost, dok je za iste ćelije u monosloju bila jako citotoksična.

#### 4.3.3 ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA

U cilju ispitivanja moguće potencijalne primene nanokompozitnih hidrogelova sa inkorporisanim nanočesticama srebra kao antimikrobnih agenasa, antibakterijska aktivnost hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra je ispitivana u suspenzijama *Staphylococcus aureus* TL i *Escherichia coli* ATCC 25922 kao najčešće korišćenim predstavnicima za Gram-pozitivnih, odnosno Gram-negativnih vrsta bakterija.

Ag/alginatne mikročestice korišćene za ispitivanje antibakterijske aktivnosti u suspenziji *S. aureus* su bile prečnika  $390 \pm 20$   $\mu$ m sa koncentracijom nanočestica srebra od  $1,2 \pm 0,05$  mM, dok su mikročestice ispitivane u suspenziji *E. coli* bile prečnika  $480 \pm 20$   $\mu$ m sa koncentracijom nanočestica srebra od  $1,7 \pm 0,2$  mM. Suve mikročestice su dobijene sušenjem odgovarajućih vlažnih mikročestica do konstantne mase i imale su prečnik u oba slučaja oko 200  $\mu$ m. U bakterijske suspenzije su unete iste količine vlažnih mikročestica (4 g) dok je količina suvih mikročestica odgovarala istoj količini od 4 g vlažnih mikročestica pre sušenja. Na taj način je obezbeđena uporednost bakterijskih kultura sa vlažnim i suvim mikročesticama.

Oba tipa mikročestica, vlažne i suve, nakon 1 h inkubacije u suspenziji *S. aureus* su dovele do blagog smanjenja koncentracije bakterija sa  $10^5$  CFU/ml na

10<sup>4</sup> CFU/ml (tabela 4.5). Međutim, u narednih 23 h vrednost koncentracije bakterija je rasla i dostigla vrednost od ~10<sup>6</sup> CFU/ml. Ipak, ova vrednost je značajno niža nego u kontrolnoj grupi nakon 24 h inkubacije pri čemu je sniženje iznosilo skoro 3 logaritamske jedinice.

**Tabela 4.5.** Broj kolonija *Staphylococcus aureus* TL u kontrolnoj suspenziji i suspenzijama sa vlažnim, odnosno suvim Ag/alginatnim mikročesticama u koncentraciji od 0,4 g/ml računato na vlažnu masu mikročestica

	Inicijalno	1h	24h
Kontrola (CFU/ml)	$3,8 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$	$2,7 \times 10^9$
Vlažne mikročestice (CFU/ml)	$3,8 \times 10^5$	$(9,5 \pm 2,1) \times 10^4$	$(6,9 \pm 1,3) \times 10^6$
Suve mikročestice (CFU/ml)	$(3,7 \pm 0,3) \times 10^5$	$(9,5 \pm 4,9) \times 10^4$	$(5,3 \pm 2,8) \times 10^6$

Slični rezultati dobijeni i u suspenziji *E. coli* gde se početna koncentracija bakterija od 10<sup>6</sup> CFU/ml smanjila nakon 1 h na 10<sup>4</sup> CFU/ml i 10<sup>5</sup> CFU/ml u prisustvu vlažnih i suvih mikročestica, redom (tabela 4.6). U narednih 23 h koncentracija bakterija je rasla u prisustvu vlažnih mikročestica i dostigla vrednost od ~10<sup>6</sup> CFU/ml. U prisustvu suvih mikročestica koncentracija bakterija je u jednom uzorku rasla do slične vrednosti od 8,5 x 10<sup>6</sup> CFU/ml kao u prisustvu vlažnih mikročestica, dok je u drugom opala na 8,6 x 10<sup>3</sup> CFU/ml. Ovaj rezultat u drugom uzorku se može objasniti eksperimentalnom greškom ili većim varijacijama otpuštenih koncentracija srebra u slučaju suvih mikročestica usled istovremenog bubrenja mikročestica i otpuštanja srebra.

**Tabela 4.6.** Broj kolonija *Escherichia coli* ATCC 25922 u kontrolnoj suspenziji i suspenziji sa vlažnim i suvim Ag/alginatnim mikročesticama u koncentraciji 0,4 g/ml računato na vlažnu masu mikročestica

	Inicijalno	1h	24h
Kontrola (CFU/ml)	$2,8 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^9$
Vlažne mikročestice (CFU/ml)	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^6$	$(8,3 \pm 0,3) \times 10^4$	$(3,1 \pm 1,5) \times 10^6$
Suve mikročestice (CFU/ml)	$(2,2 \pm 0,4) \times 10^6$	$(5,0 \pm 3,7) \times 10^5$	$8,5 \times 10^6$ $8,6 \times 10^3$

Da bi se objasnio uticaj Ag/alginatnih mikročestica na bakterijsku kulturu izveden je analogni eksperiment u fiziološkom rastvoru pod istim uslovima korišćenjem vlažnih Ag/alginatnih mikročestica sa koncentracijom nanočestica srebra od  $1,38 \pm 0,02$  mM i prečnika  $440 \pm 20$   $\mu$ m i suvih Ag/alginatnih mikročestica sa koncentracijom nanočestica srebra od  $1,21 \pm 0,04$  mM i prečnika  $320 \pm 60$   $\mu$ m. Koncentracije otpuštenih slobodnih jona srebra se nisu značajno razlikovale u svim uzorcima i srednja izmerena vrednost je iznosila  $0,53 \pm 0,06$   $\mu$ g/ml. Ova vrednost odgovara rezultatima koncentracije slobodnih jona srebra dobijenim prilikom ispitivanja citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica (odjeljak 4.3.2.2). Međutim, kada je izmeren ukupan sadržaj otpuštenog srebra kao Ag<sup>+</sup> i AgCl u fiziološkom rastvoru dobijene su različite vrednosti. Za vlažne mikročestice koncentracije ukupnog otpuštenog srebra su iznosile  $0,58 \pm 0,09$   $\mu$ g/ml posle 1 h i  $10,3 \pm 3,0$   $\mu$ g/ml posle 24 h. Ove vrednosti za suve mikročestice su iznosile  $1,67 \pm 0,62$   $\mu$ g/ml i  $2,44 \pm 0,05$   $\mu$ g/ml, nakon 1 h i 24 h, redom. Dobijeni rezultati ukazuju da otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u opsegu koncentracija od 0,6-10  $\mu$ g/ml u rastvoru ima približno bakteriostatski efekat.

#### 4.4 IN VIVO ISPITIVANJA

U cilju ispitivanja potencijalne primene Ag/alginatnih nanokompozita kao obloga za rane praćeno je zarastanje rana na modelu opekotina II stepena kod pacova i miševa, kao i na modelu nekroze kod pacova pri čemu su rane bile tretirane različitim formama nanokompozita. Korišćeni su koloidni rastvori opisani u poglavlju 4.1.4, vlažna i suva mikrovlakna opisana u poglavlju 4.2.5 i suva mikrovlakna sa medom opisana u poglavlju 4.2.6.

##### 4.4.1 UTICAJ Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITA NA ZARASTANJE OPEKOTINA II STEPENA KOD PACOVA

Model opekotina II stepena kod pacova je korišćen za ispitivanje potencijalne primene Ag/alginatnih nanokompozita u nekoliko oblika u tretmanu rana pri čemu je makroskopski i mikroskopski praćeno zarastanje rana u toku vremena. Ispitivani su uticaji Ag/alginatnog koloidnog rastvora, vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana, kao i komercijalne kreme sa srebrom u obliku srebro sulfodiazina i komercijalne obloge na bazi kalcijum-alginatnih mikrovlakana sa jonskim srebrom. Izvedene su dve eksperimentalne serije sa dve kontrolne grupe kod kojih su opekotine samo dnevno ispirane fiziološkim rastvorom. Na slici 4.52 je prikazana opekotina II stepena kod pacova nakon indukcije.

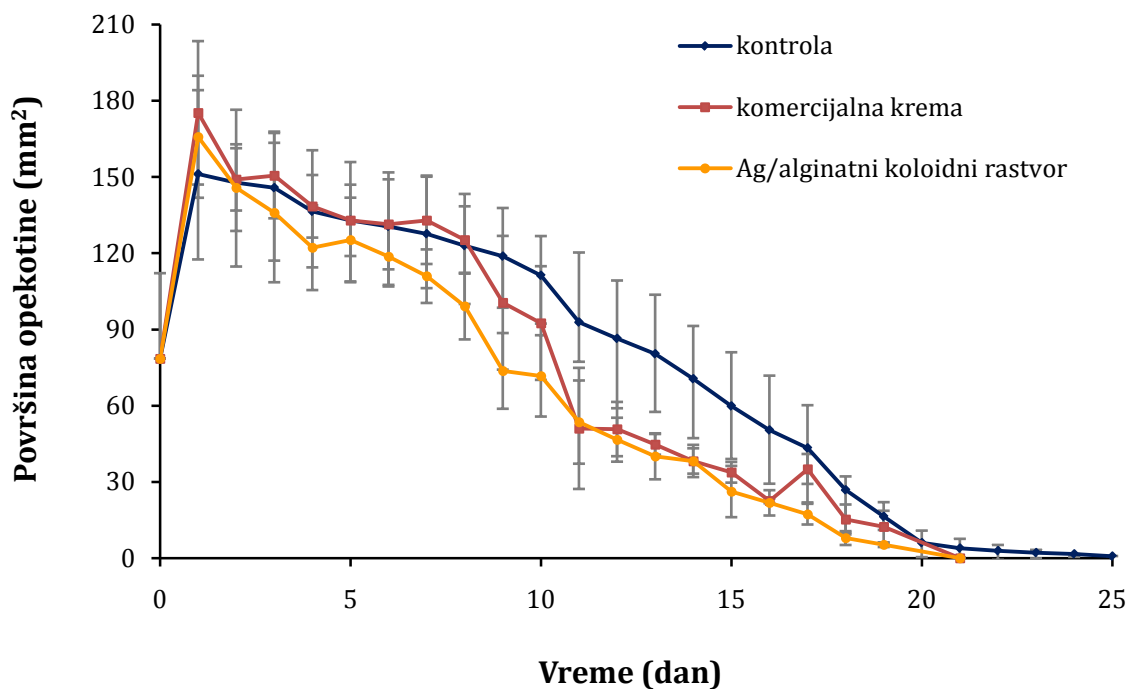


**Slika 4.52.** Opekotina II stepena kod mužjaka *Wistar* pacova nakon indukcije

#### 4.4.1.1 ISPITIVANJE EFIKASNOSTI Ag/ALGINATNOG KOLOIDNOG RASTVORA SA ASKORBINSKOM KISELINOM NA MODELU OPEKOTINA II STEPENA KOD PACOVA

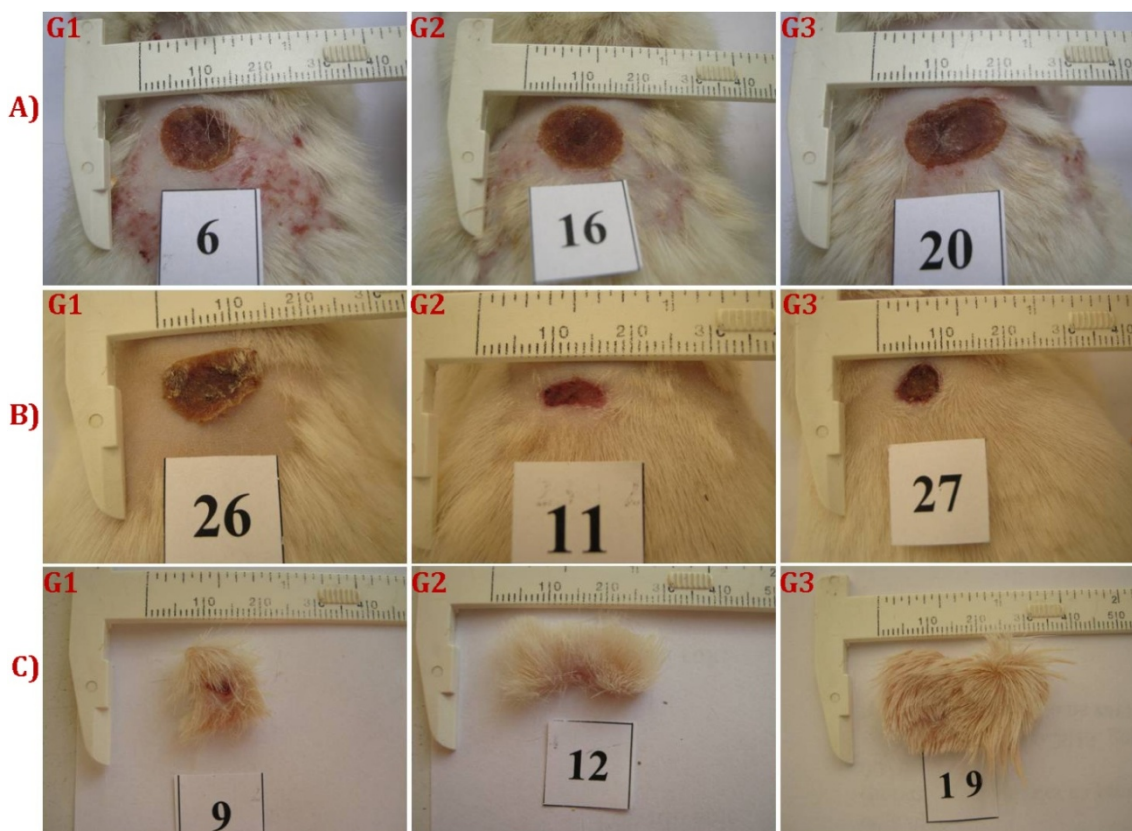
Efikasnost Ag/alginatnog koloidnog rastvora za zarastanje rana opekotina II stepena na pacovima je upoređena sa komercijalnom kremom i netretiranom kontrolnom grupom (grupa G1). Naime, Ag/alginatni koloidni rastvor je sadržao nanočestice srebra u koncentraciji od 1 mM, rastvor Na-alginata koncentracije 1,73 mas.% i askorbinsku kiselinu u koncentraciji od 0,1 mg/ml. Rastvori su imali pH ~7. Komercijalna krema koja je korišćena je široko primenjivana u tretmanu rana sa farmakološki aktivnom supstancom srebro sulfodiazinom u koncentraciji od 1 mas.%. Nakon indukovanja opekotine, rane u grupi G2 su svakodnevno tretirane sa  $155 \pm 21$  mg komercijalne kreme, a u grupi G3 sa 120  $\mu$ l koloidnog rastvora sa askorbinskom kiselinom. Tokom ispitivanja, sve životinje su se ponašale normalno, i nije detektovana infekcija rana bilo makroskopski bilo mikroskopski.

Na slici 4.53 je prikazana zavisnost površine opekotine od vremena za sve tri ispitivane grupe gde se na osnovu kontrakcije rane procenjuje ozdravljenje rane.



**Slika 4.53.** Zavisnost površine opekotine od vremena za kontrolnu grupu (G1), grupu tretiranu komercijalnom kremom (G2) i grupu tretiranu Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3) (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja)

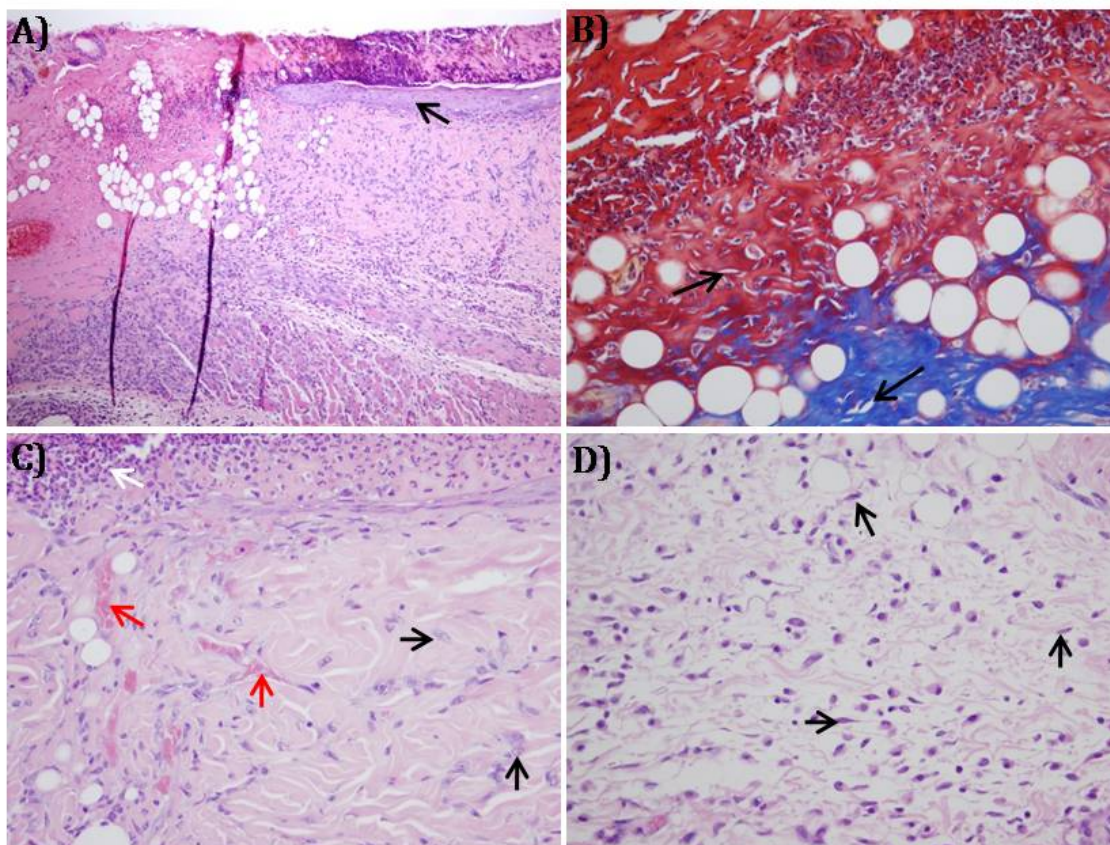
Eksperimentalna merenja su pokazala da je posle jednog dana od izazivanja termičkih povreda, površina rane iznosila  $154,42 \pm 12,14 \text{ mm}^2$ , što je oko 2 puta više u odnosu na početnu površinu opekotine ( $78,5 \text{ mm}^2$ ). Potom su rane u svim grupama počele da se kontinualno kontrahuju sve do potpune obnove tkiva, s'tim da je brže zarastanje opekotine zapaženo u tretiranim grupama u odnosu na netretiranu kontrolu. U grupama G2 i G3 kraste su otpale između 10-og i 12-og dana od indukcije povrede, a do potpunog zarastanja rana je došlo nakon 21-og dana (slika 4.54). U kontrolnoj grupi G1 kraste su otpale između 15-og i 16-og dana od indukcije povrede, a do potpunog zarastanja došlo je nakon 25 dana (slika 4.54). Treba primetiti da iako se rezultati nisu statistički značajno razlikovali, zarastanje opekotina je bilo blago efikasnije u grupi koja je tretirana Ag/alginatnim koloidnim rastvorom u odnosu na tretman komercijalnom kremom.



**Slika 4.54.** Klinička evaluacija ozdravljenja opekotina drugog stepena kod mužjaka *Wistar* pacova u kontrolnoj grupi (G1), grupi tretiranoj komercijalnom kremom (G2) i grupi tretiranoj Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3): A) termičke lezije 4 dana posle izazivanja opekotine; B) termičke lezije 11 dana posle izazivanja opekotine; C) termičke lezije 21 dan posle indukovanja opekotine

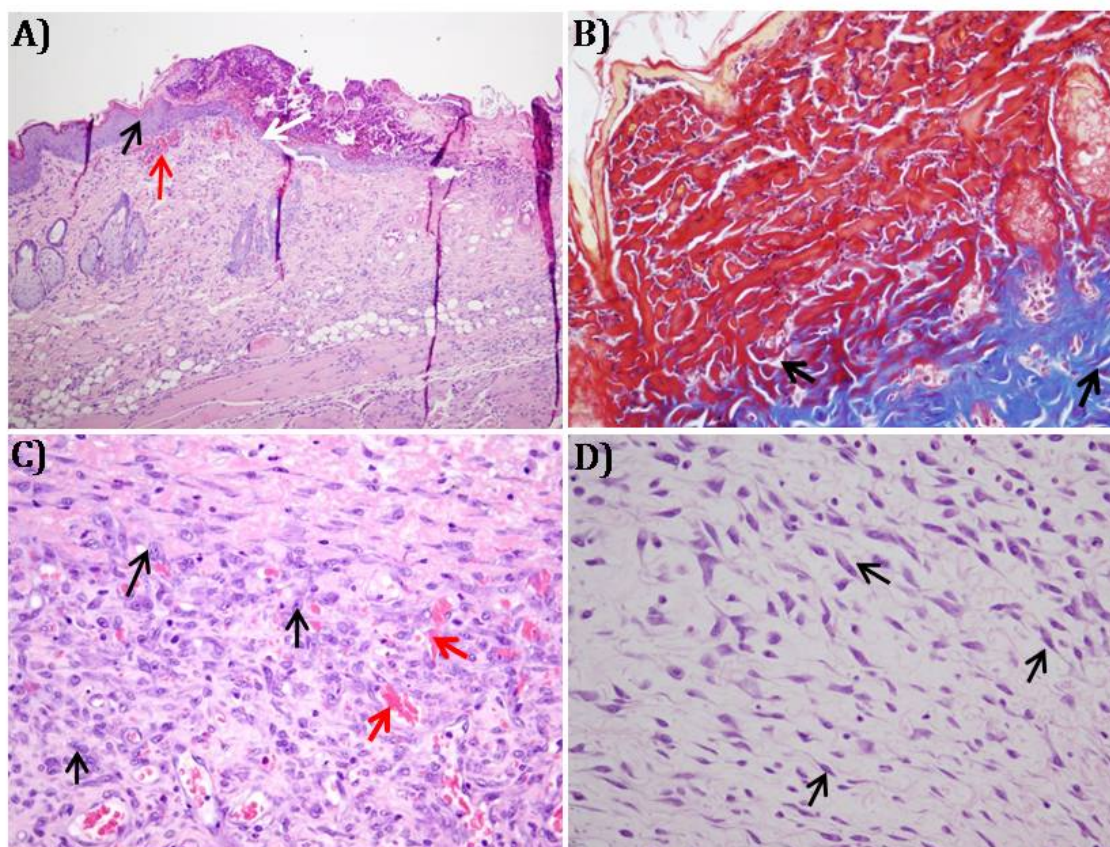
Makroskopski nalazi su potkrepljeni i rezultatima histopatološke analize. Na slikama 4.55, 4.56, 4.57 su prikazani reprezentativni histopatološki preseki kože 4 dana nakon indukcije opekotine uzoraka različitih grupa. Može se uočiti edem, početak reepitelizacije i angiogeneze, brojni neutrofili, makrofagi, kao i granulaciono tkivo sastavljeno od fibroblasta i novostvorenih krvnih sudova, pri čemu plavo obojenje ukazuje na prisustvo kolagenih vlakana. Analiza preseka kože ukazuje na gust subepidermalni infiltrat od neutrofila u svim ispitivanim grupama što odgovara inflamatornoj fazi zarastanja rana (tabela 4.7). Takođe, zapaža se da je u grupi G3 edem manje izražen u odnosu na kontrolnu grupu (G1) i grupu tretiranu komercijalnom kremom (G2) i ova razlika je statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Može se uočiti i da je početak reepitelizacije i angiogeneze nešto izraženiji u grupi

G3 u odnosu na grupe G1 i G2, ali ove promene nisu bile statistički značajne. Takođe, u grupi G3 je detektovani veći broj makrofagi u odnosu na ostale grupe i ova razlika je bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ).

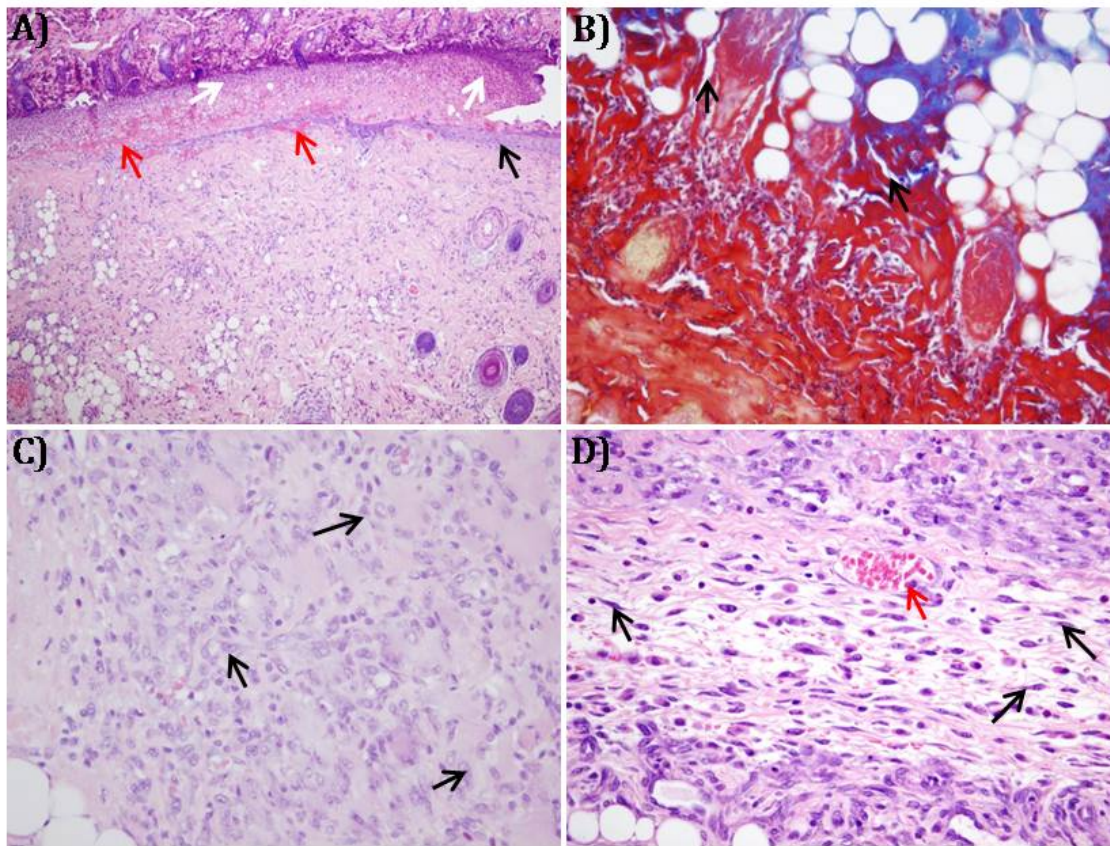


**Slika 4.55.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crna strelica pokazuje početak reepitelizacije; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crne strelice označavaju edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C) bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila, crne strelice označavaju retke makrofage, dok crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 200x; D) crne strelice označavaju fibroblaste; H&E bojenje, uveličanje 400x





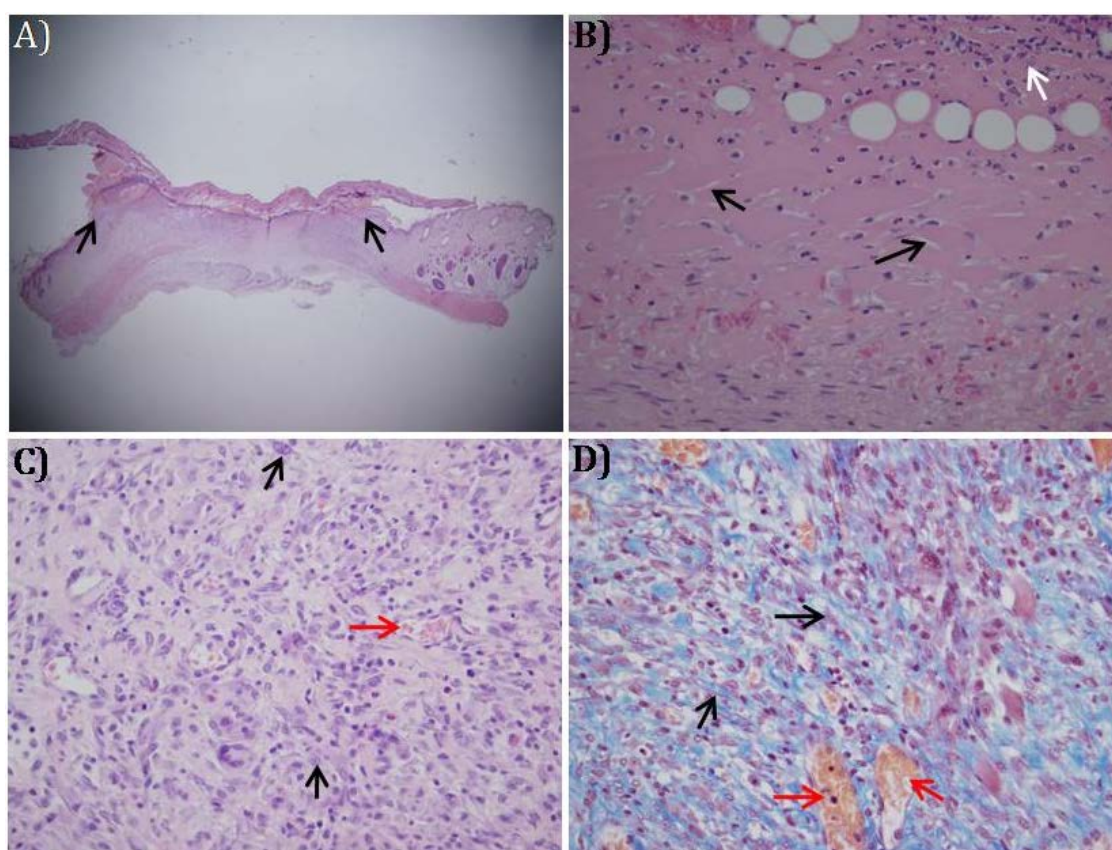
**Slika 4.56.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom kremom (G2): A) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvena strelica označava novostvoreni krvni sud, dok crna strelica pokazuje početak reepitelizacije; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crne strelice označavaju edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje uveličanje 200x; D) crne strelice označavaju fibroblaste; H&E bojenje, uveličanje 400x



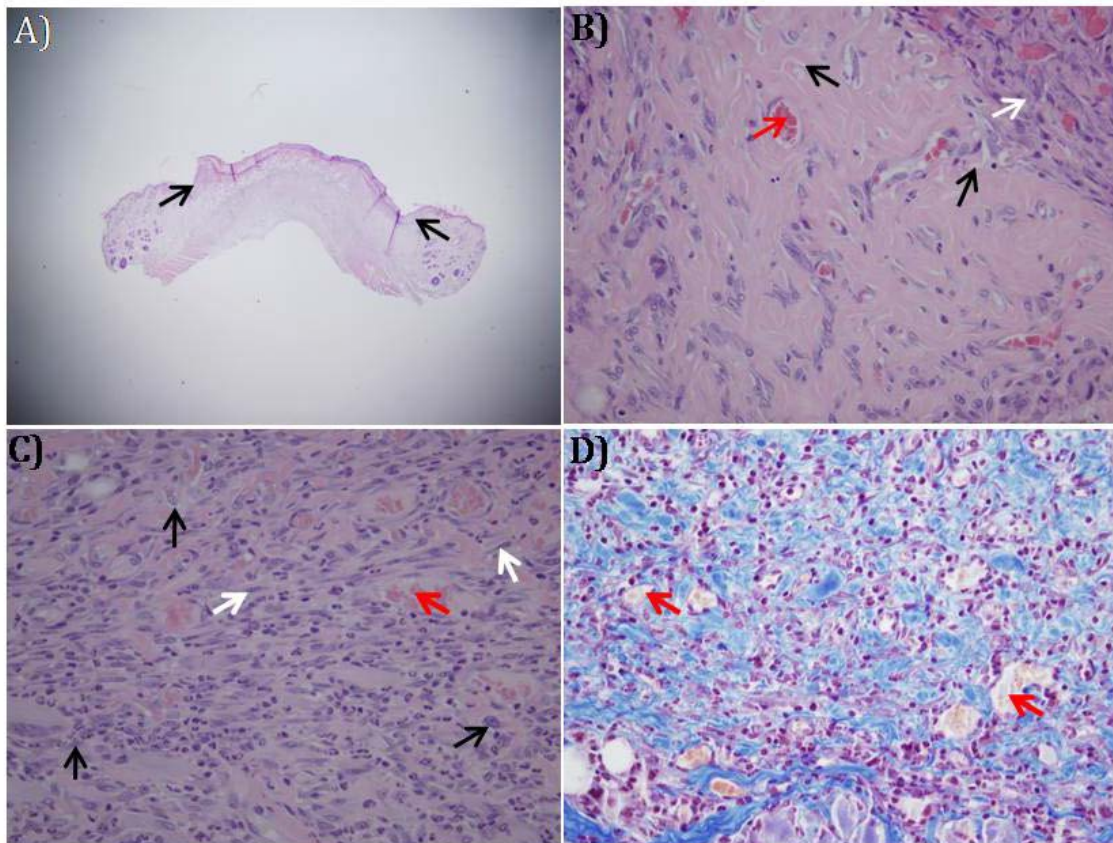
**Slika 4.57.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3): A) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, dok crna strelica pokazuje početak reepitelizacije; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crne strelice označavaju edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C) crne strelice označavaju makrofage; H&E bojenje, uveličanje 200x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, a crvena strelica označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x

Na slikama 4.58, 4.59 i 4.60 su prikazani reprezentativni histopatološki preseki kože 11 dana nakon indukovanja opekotine u različitim grupama na kojima se mogu uočiti edem, reepitelizacija i angiogeneza, neutrofilni, makrofagi, kao i fibroblasti pri čemu plavo obojenje ukazuje na prisustvo kolagenih vlakana. Histopatološka analiza preseka kože pokazala je da u uzorcima kože životinja svih grupa postoji umereni subepidermalni neutrofilni ćelijski infiltrat, kao i izražena

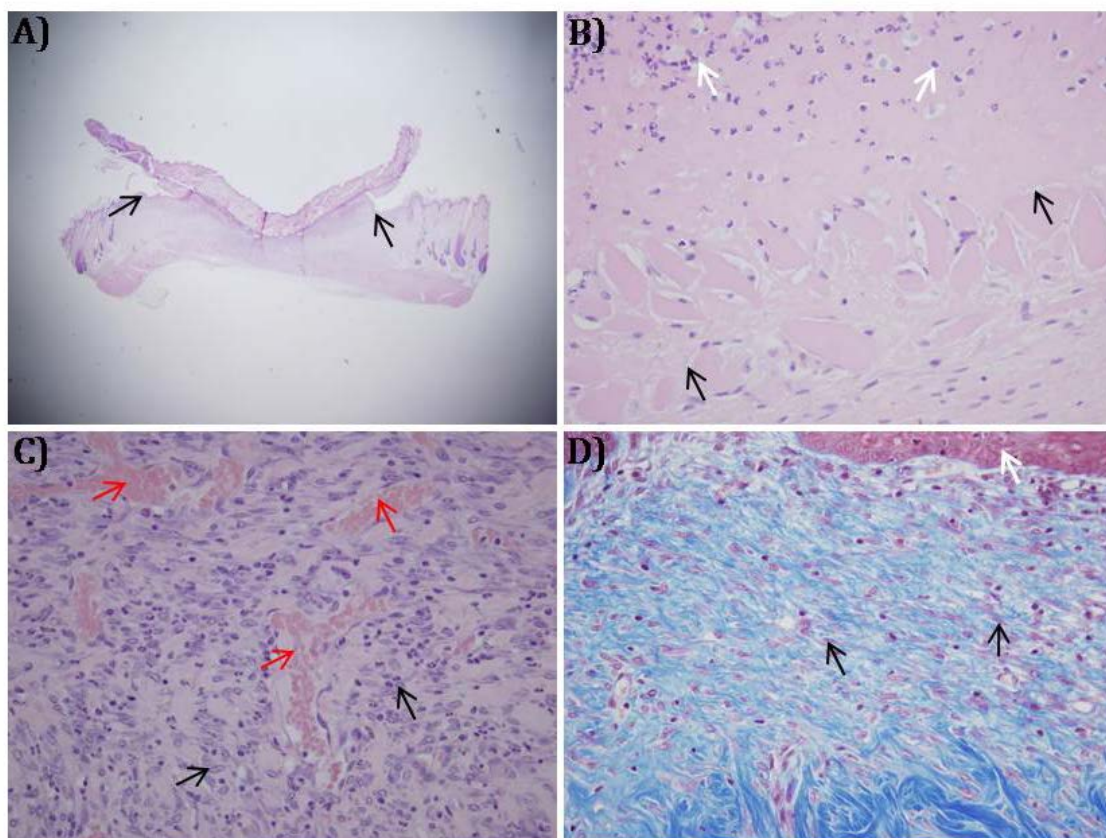
angiogeneza što odgovara proliferativnoj fazi zarastanja rana (tabela 4.7). Takođe su i makrofagi prisutni u svim uzorcima, ali njihov broj varira, pa su tako u grupi G1 u svim uzorcima prisutni u velikom broju, dok u grupama G2 i G3 broj varira od slučaja do slučaja. Reepitelizacija je uočena u svim slučajevima, s'tim što je u grupi G3 najizraženija, ali nije nađena statistički značajna razlika u odnosu na druge dve grupe (G1 i G2). U većini slučajeva svih ispitivanih grupa postoji manji broj fibroblasta uz lakostepenu fibrozu, dok je edem tkiva slabo izražen u grupama G1 i G2, a u grupi G3 primećen kod 2 od 3 životinje.



**Slika 4.58.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crna strelica pokazuje reepitelizaciju; H&E bojenje, uvećanje 12,5x; B) crne strelice označavaju edem, bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila; H&E bojenje, uvećanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvena strelica označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uvećanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, pri čemu plava obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uvećanje 400x



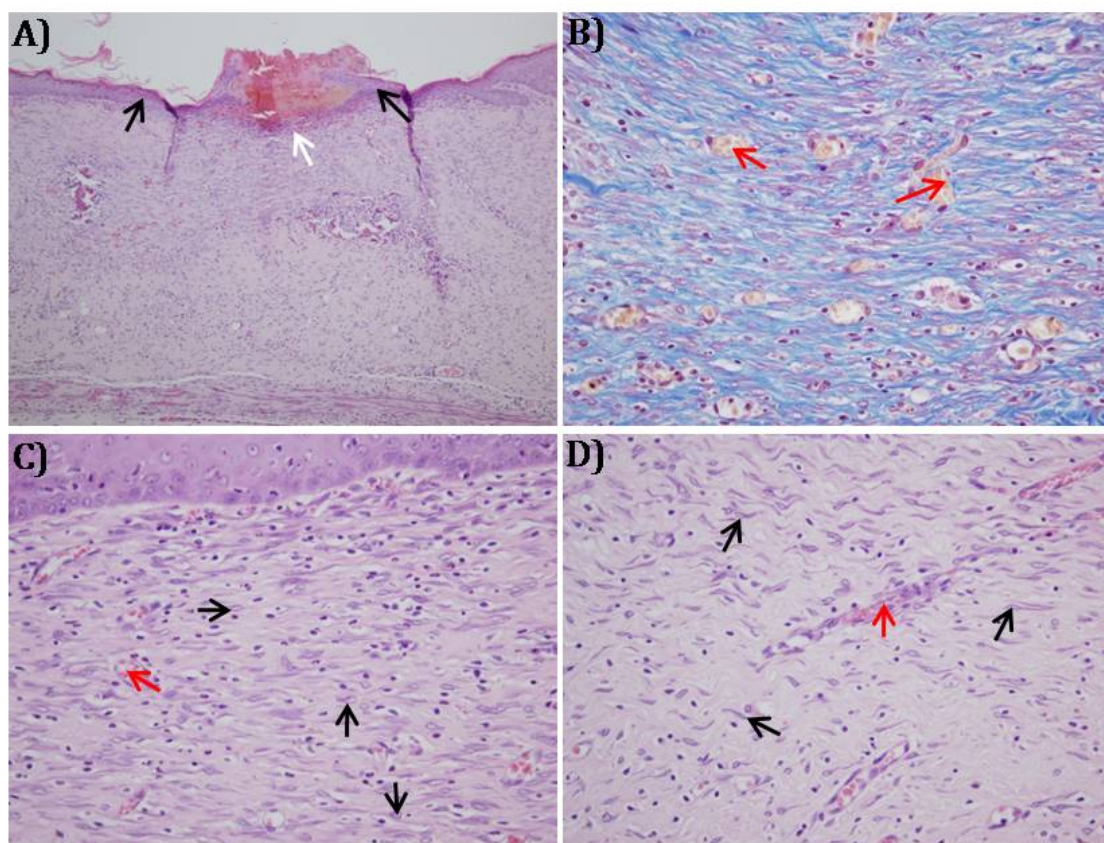
**Slika 4.59.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom kremom (G2): A) crne strelice pokazuju reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 12,5x; B) crne strelice označavaju edem, bela strelica pokazuje neutrofile, dok crvena označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, bele strelice pokazuju fibroblaste, dok crvena označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x



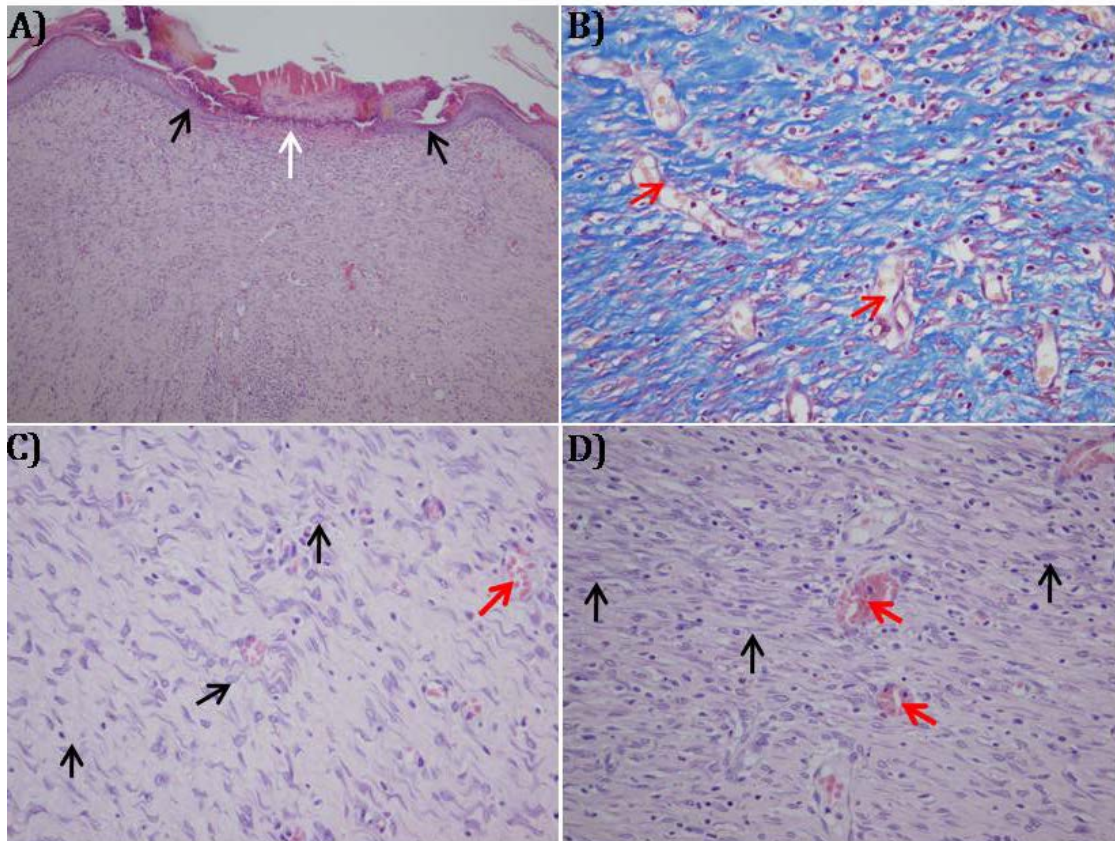
**Slika 4.60.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3): A) crne strelice pokazuju početak reepitelizacije; H&E bojenje, uveličanje 12,5x; B) crne strelice označavaju edem, dok bele strelice pokazuju neutrofile; H&E bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvene strelice označavaju brojne novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) bela strelica pokazuje reepitelizaciju, crne strelice pokazuju fibroblaste, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x

Na slikama 4.61, 4.62 i 4.63 su prikazani reprezentativni histopatološki preseki kože 21 dan nakon indukcije opekotine u različitim grupama na kojima se mogu uočiti retki neutrofile, makrofagi, fibroblasti, kolagena vlakna, kao i reepitelizacija i angiogeneza. Analizom histopatoloških preseka utvrđeno je odsustvo subepidermalnih neutrofila kod grupe G3, za razliku od grupa G1 i G2, gde su se mogli videti retki neutrofile i ovaj nalaz je bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ) (tabela 4.7). Takođe, uočeno je i odsustvo edema u sve tri ispitivane grupe. Angiogeneza je u svim grupama bila manje izražena u poređenju sa njenim

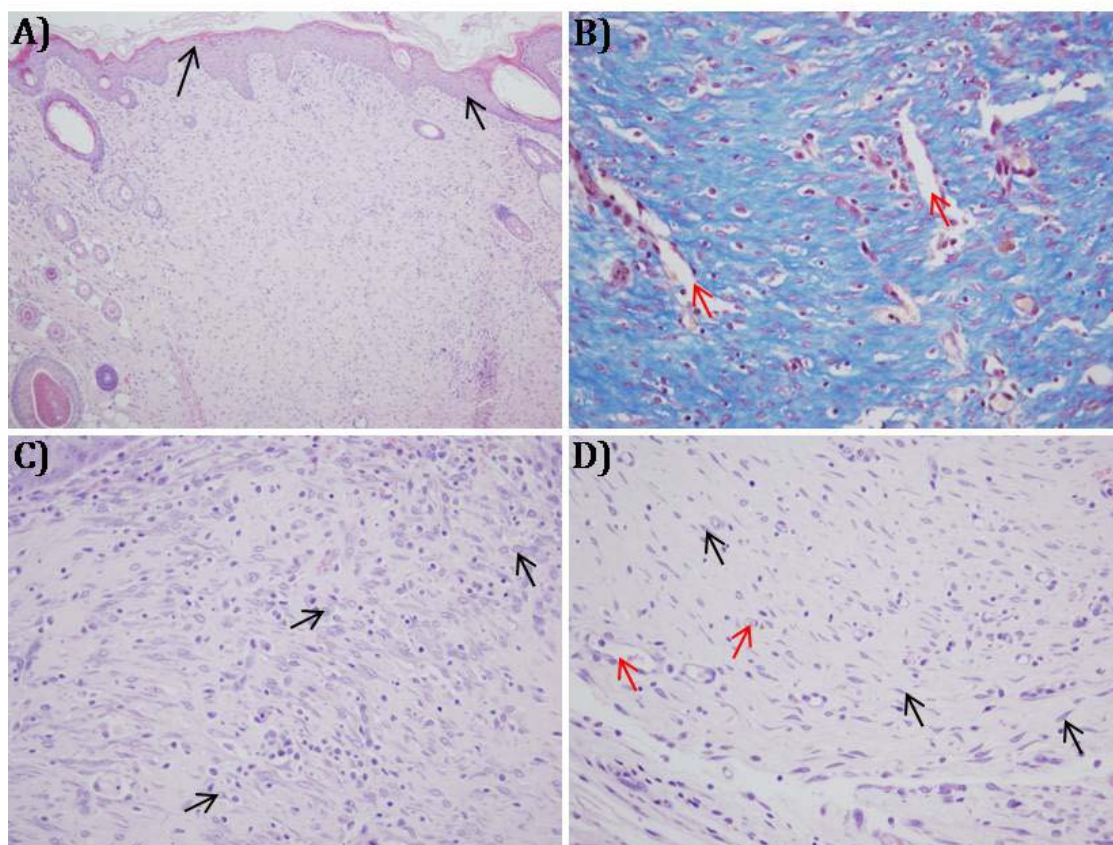
intenzitetom u prethodnoj eksperimentalnoj tački i u tretiranim grupama G2 i G3 je bila lakostepena, dok je u kontrolnoj grupi G1 bila umerenog stepena. Takođe, uočeno je i smanjenje broj makrofaga u odnosu na prethodnu eksperimentalnu tačku, dok je reepitelizacija napredovala i u grupama G1 i G2 je obuhvatila više od 2/3 opečene površine, dok je u grupi G3 bila potpuna. Veliki broj fibroblasta se uočava u svim grupama, ali je značajna količina novosintetisanog kolagena zapažena u grupi G3.



**Slika 4.61.** Histopatološki nalaz kože 21 dan nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe G1: A) bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila, crne strelice pokazuju reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvena strelica označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, crvena strelica označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.62.** Histopatološki nalaz kože 21 dan nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom kremom (G2): A) bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila, crne strelice pokazuje reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvena označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, a crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.63.** Histopatološki nalaz kože 21 dan nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3): A), crne strelice pokazuju potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju brojne fibroblaste, dok crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x

U tabeli 4.7 su sumirani rezultati histopatološke analize uzoraka tkiva kože životinja svih grupa odnosno opečenih netretiranih životinja (G1), životinja tretiranih komercijalnom kremom (G2) i životinja tretiranih Ag/alginatnim koloidnim rastvorom sa askorbinskom kiselinom (G3).



**Tabela 4.7.** Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize tkiva kože opečenih netretiranih životinja (G1), tretiranih komercijalnom kremom (G2) i tretiranih Ag/alginatnim koloidnim rastvorom sa askorbinskom kiselinom (G3)

Vreme (dan)	Parametar	G1	G2	G3
4.	Broj životinja	3	3	3
	Reepitalizacija	0	0(0-1)+	1(0-1)+
	Angiogeneza	0,5(0-1)+	0	1(0-2)+
	Edem	2	3(2-3)+	1+ <sup>*a,b</sup>
	Fibroblasti	0	0	1(0-2)+
	Makrofagi	0,5(0-1)+	0	1(1-2)+ <sup>*a,b</sup>
	Subepidermalni neutrofilni	3+	3+	3+
11.	Broj životinja	3	3	3
	Reepitalizacija	1(1-3)+	1+	2(1-2)+
	Angiogeneza	3+	3(2-3)+	3+
	Edem	1+	1+	0(0-1)+
	Fibroblasti	1(1-2)+	1+	1+
	Makrofagi	3	2(1-3)+	2(2-3)+
	Subepidermalni neutrofilni	2(2-3)+	3+	2+
21.	Broj životinja	3	3	3
	Reepitalizacija	3+	3+	3+
	Angiogeneza	2+	1(1-2)+	1+ <sup>*a</sup>
	Edem	0	0	0
	Fibroblasti	3+	3(2-3)+	3+
	Makrofagi	2+	2(1-3)+	1(1-2)+
	Subepidermalni neutrofilni	1+	1+	0 <sup>*a,b</sup>

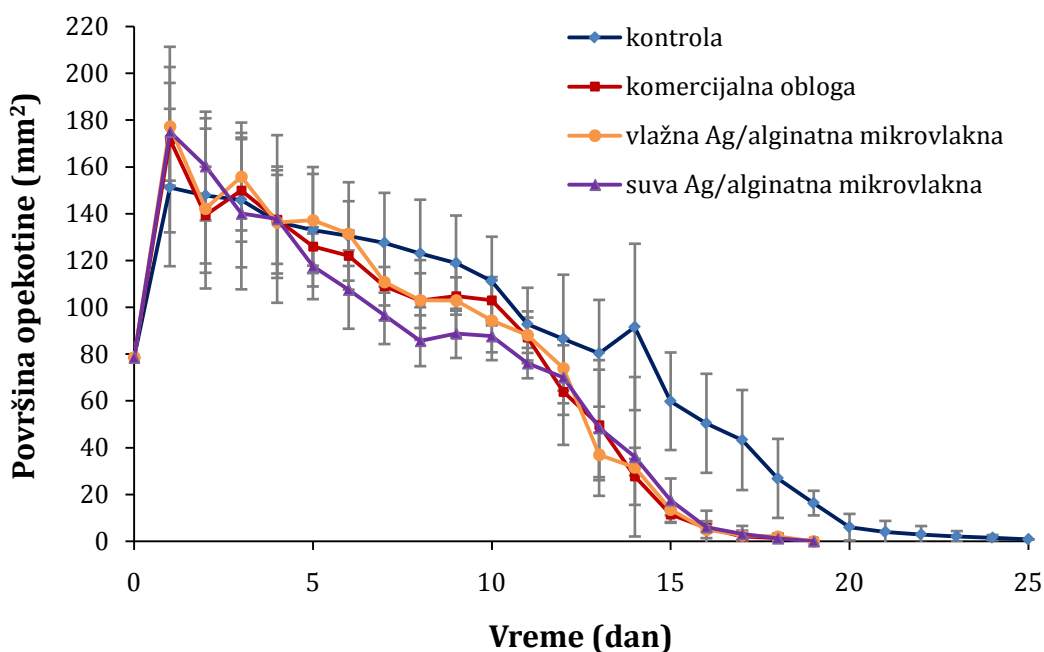
<sup>\*a</sup>: značajna razlika između grupa G3 i G1 ( $p < 0,05$ ); <sup>\*b</sup>: značajna razlika između grupa G3 i G2 ( $p < 0,05$ ); p je računato Man-Vitni (*Mann-Whitney*) testom. Subepidermalni neutrofilni, angiogeneza, edem, broj fibroblasta i makrofaga su procenjivani prema procentu njihovih gustina na 40x uvećanoj zoni opekotine.

Skorovanje pomenutih parametara se određivalo na sledeći način: 0 - između 0 i 10%; 1 - između 10 i 40%; 2 - između 40 i 70% i 3 - između 70 i 100%. Trajanje reepitelizacije je procenjivano na 40x uvećanim sekcijama. Skorovanje je bilo 0 - kada nije bilo reepitelizacije, 1 - kada je reepitelizovalo do 1/3 opečene površine, 2 - kada je reepitelizovalo do 2/3 opečene površine, 3 - kada je reepitelizovalo više od 2/3 opečene površine.

#### 4.4.1.2 ISPITIVANJA EFIKASNOSTI Ag/ALGINATNIH MIKROVLAKANA NA MODELU OPEKOTINA II STEPENA KOD PACOVA

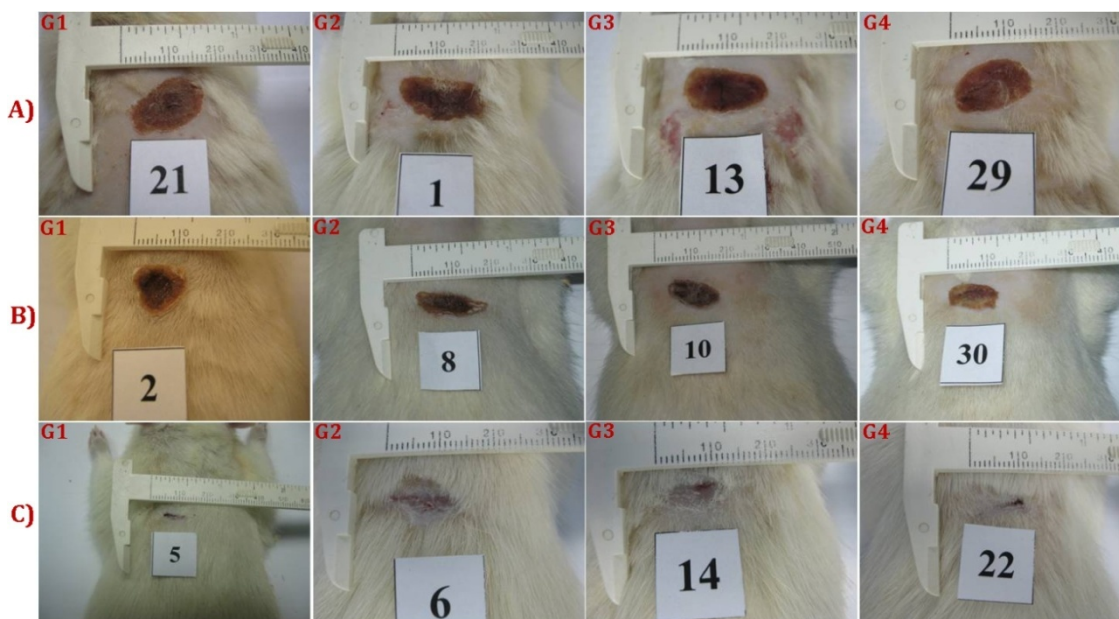
Efikasnost Ag/alginatnih mikrovlakana za zarastanje rana je ispitivana *in vivo* na opekotinama II stepena kod pacova pri čemu su vlažna i suva mikrovlakna upoređena sa komercijalnom oblogom za rane i netretiranom kontrolnom grupom (G1). Mikrovlakna korišćena u ovoj studiji su opisana u poglavlju 4.2.5, sa koncentracijom nanočestica u vlažnim i suvim mikrovlaknima od  $1,5 \pm 0,3$  mM i  $1,6 \pm 0,5$  mM, redom. Komercijalna obloga za rane korišćena u ovoj studiji je na bazi suvih Ca-alginatnih mikrovlakana (prečnik  $15 \pm 4$   $\mu$ m) i jona srebra u koncentracij od  $7,24 \pm 0,37$  mas.%. Nakon indukovanja opekotine, rane su svakodnevno tretirane u grupi G2 sa  $24 \pm 2$  mg komercijalne obloge, u grupi G3 sa  $216 \pm 14$  mg vlažnih Ag/alginatnih mikrovlakana i u grupi G4 sa  $9 \pm 1$  mg suvih Ag/alginatnih mikrovlakana što odgovara približno istoj masi vlažnih vlakana. Tokom ispitivanja, sve životinje su se ponašale normalno, i nije detektovana infekcija rana bilo makroskopski bilo mikroskopski.

Na slici 4.64 je prikazana zavisnost površine opekotine rane od vremena za sve četiri ispitivane grupe gde se na osnovu kontrakcije rane procenjuje ozdravljenje rane. Nakon jednog dana od indukcije opekotine, površine rana se nisu značajno razlikovale između eksperimentalnih grupa i iznosile su oko  $159,7 \pm 35,4$  mm<sup>2</sup> što je ~2 puta više u odnosu na početnu opekotinu ( $78,5$  mm<sup>2</sup>). Potom su rane počele da se kontinualno kontrahuju u svim ispitivanim grupama do potpune obnove tkiva (slika 4.64).



**Slika 4.64.** Zavisnost površine opekotine od vremena za kontrolnu grupu (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2), grupu tretiranu vlažnim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) i grupu tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G4) (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja)

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da su se rane brže kontrahovale u tretiranim grupama u odnosu na netretiranu kontrolu. Međutim, i ovde nema statistički značajnih razlika između dobijenih rezultata u tretiranim grupama gde je do potpunog zarastanja došlo istog dana. Kraste su u grupama G2, G3 i G4 otpale između 10-og i 12-og dana od indukcije povrede, dok je do potpunog zarastanja rana došlo nakon 19 dana (slika 4.65). Kod kontrolne grupe (G1) je korišćena kontrola opisana u poglavlju 4.4.1.2 kod koje su kraste otpale između 15-og i 16-og dana od indukcije povrede, dok je do potpunog zarastanja rana došlo nakon 25 dana.

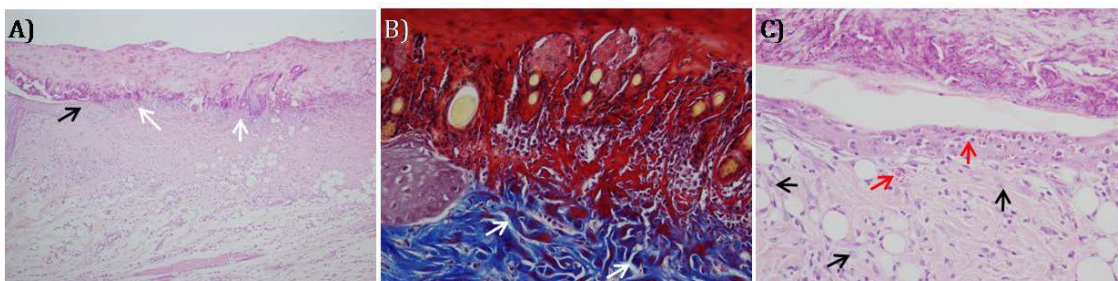


**Slika 4.65.** Klinička evaluacija ozdravljenja opekotina drugog stepena kod mužjaka *Wistar* pacova u kontrolnoj grupi (G1), grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2), grupi tretiranoj vlažnim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) i grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G4): A) termičke lezije posle 4 dana od izazivanja opekotine; B) termičke lezije posle 11 dana od izazivanja opekotine; C) termičke lezije posle 19 dan od indukovanja opekotine

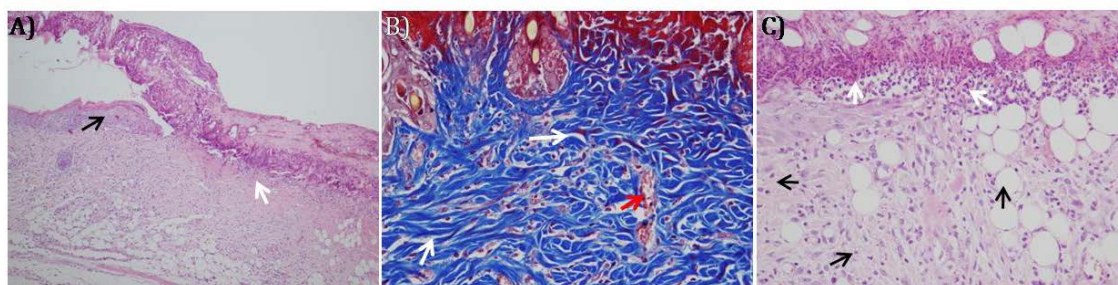
Makroskopski dobijeni podaci su potkrepljeni histopatološkom analizom nakon 4, 11 i 19 dana od indukcije opekotine.

Na slikama 4.55, 4.66, 4.67, i 4.68 su prikazani reprezentativni histopatološki nalazi preseka kože 4 dana nakon indukovanja opekotine u različitim grupama gde se može uočiti, edem, neutrofili, makrofagi, kao i reepitelizacija i angiogeneza pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna. Histopatološka analiza preseka kože pokazala je da u uzorcima kože životinja svih grupa postoji gust subepidermalni infiltrat od neutrofila što odgovara inflamatornoj fazi procesa zarastanja rane (tabela 4.8). Takođe, uočava se edem u svim ispitivanim grupama, ali je izraženiji u tretiranim grupama G2, G3 i G4 u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu G1. Makrofagi su uočeni u manjem broju kod svih ispitivanih grupa. Početak reepitelizacije se uočava kod svih životinja

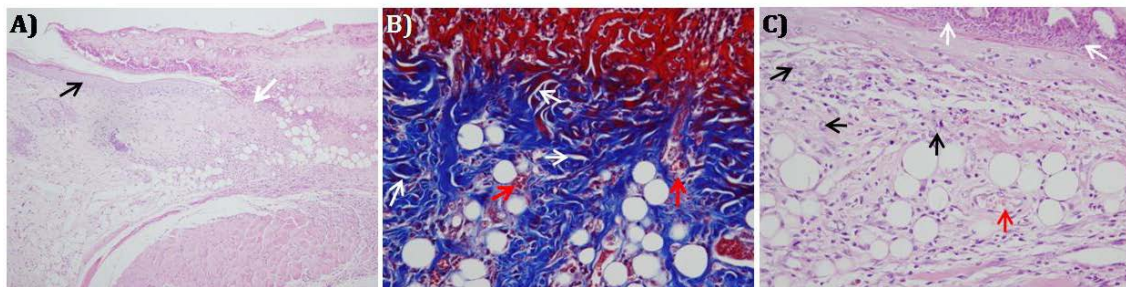
grupe G4, kod 2 od 3 životinje grupe G3 i kod 1 od 3 životinje u grupama G2 i G1. Kod svih životinja grupa G3 i G4 uočava se početak angiogeneze, dok je u grupi G2 prisutan kod 2 od 3 životinje, odnosno kod 1 od 3 životinje u grupi G1.



**Slika 4.66.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2): A) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrate sastavljen od neutrofila, dok crna strelica pokazuje reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) bele strelice označavaju edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, dok crne strelice predstavljaju makrofage; H&E bojenje, uveličanje 400x

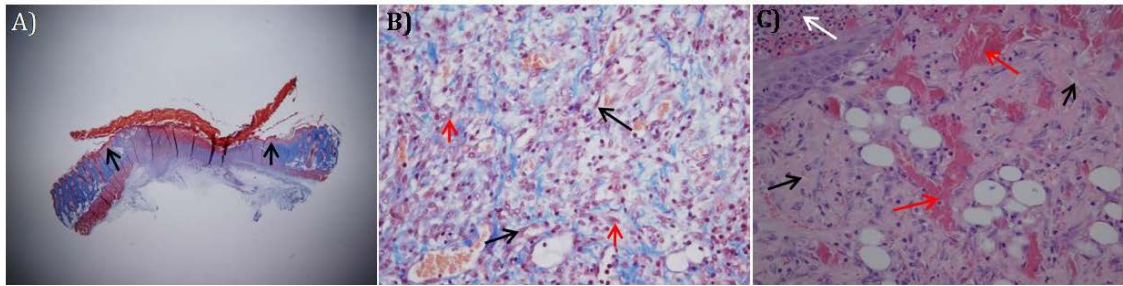


**Slika 4.67.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane vlažnim mikrovlaknima (G3): A) bela strelica označava subepidermalni infiltrata od neutrofile, dok crna strelica pokazuje reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) bele strelice označavaju edem, crvena strelica označava novostvoreni krvni sud pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrate sastavljen od neutrofila, dok crne strelice predstavljaju makrofage; H&E bojenje, uveličanje 400x

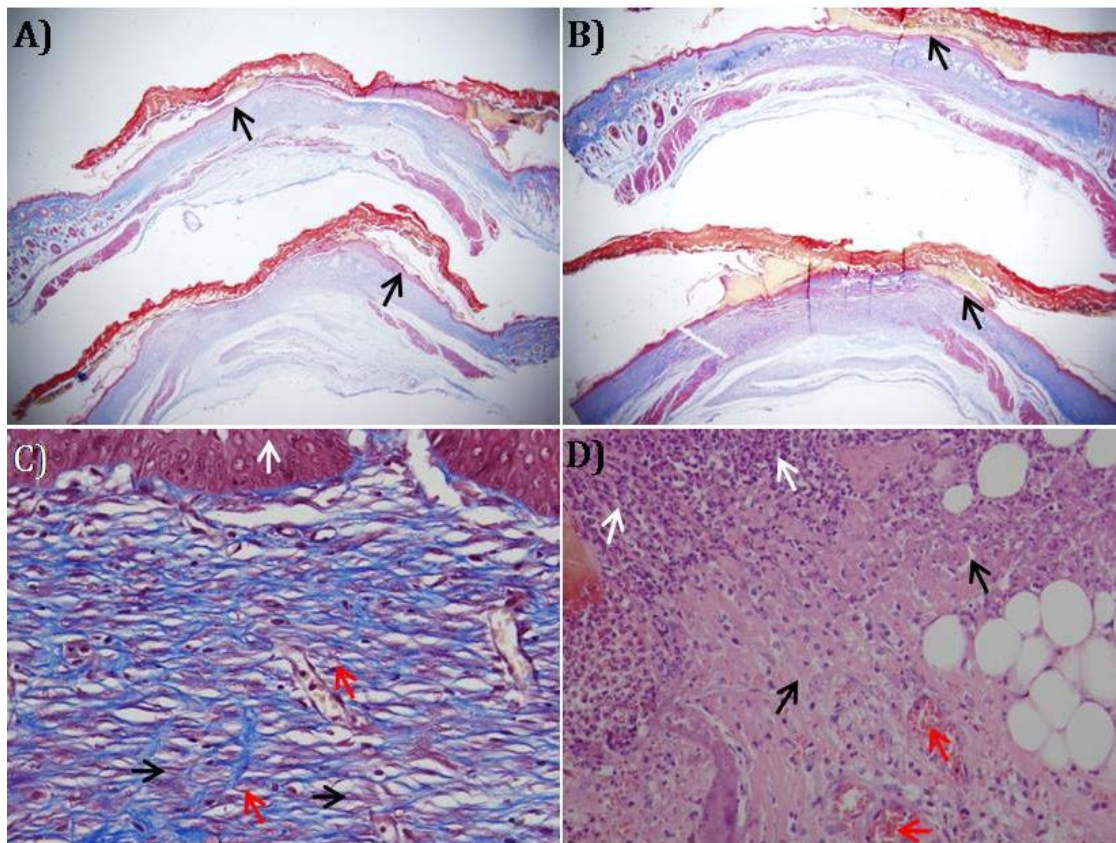


**Slika 4.68.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim mikrovlaknima (G4): A) bela strelica označava subepidermalni infiltrata sastavljen od neutrofila, dok crna strelica pokazuje reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) bele strelice označavaju edem, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrata sastavljen od neutrofile, crne strelice predstavljaju makrofage, dok crvena strelica označavaja novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x

Na slikama 4.58, 4.69, 4.70, 4.71 i 4.72 su prikazani reprezentativni histopatološki nalazi preseka kože 11 dana nakon indukovanja opekotine kod različitih grupa gde se ponovo mogu uočiti neutrofilni infiltrat, makrofagi, fibroblasti, edem, reepitelizacija i angiogeneza, kao i kolagena vlakna. Analiza histopatoloških preseka uzoraka kože životinja svih grupa je pokazala umereni subepidermalni neutrofilni infiltrat, varijabilnu zastupljenost makrofaga u dermu, kao i izraženu angiogenezu što odgovara proliferativnoj fazi zarastanja rane (tabela 4.8). Edem tkiva je lakog stepena kod svih ispitivanih životinja, dok broj fibroblasta varira između ispitivanih grupa (postoji statistička značajnost u razlici u broju fibroblasta između grupa G2 i G4,  $p < 0,05$ ). Reepitelizacija se uočava kod svih životinja i u tretiranim grupama G2, G3 i G4 je umerena kod 2 od 3 životinje (između 1/3 i 2/3 površine opekotine), dok je kod po jedne životinje iz svake grupe obuhvatala više od 2/3 površine opekotine. Kod kontrolne grupe G1 reepitelizacija je nešto manjeg intenziteta u odnosu na tretirane grupe, ali ne postoji statistički značajna razlika.

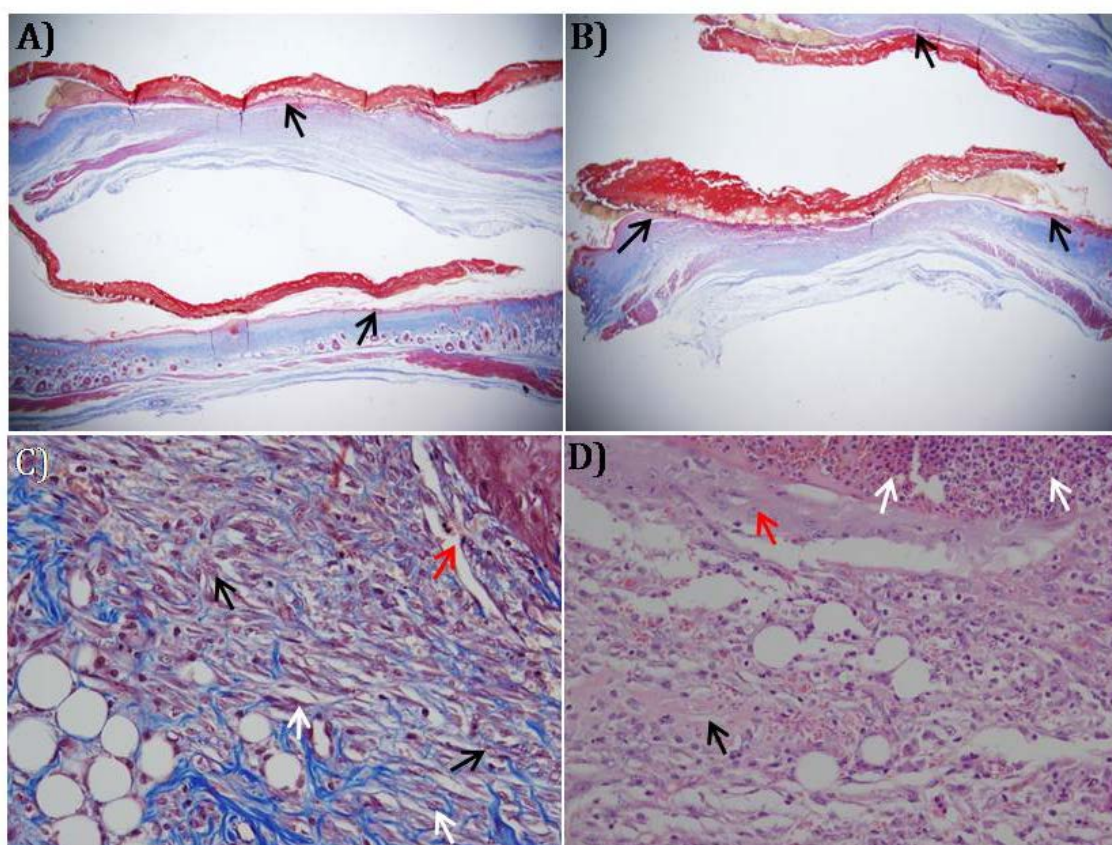


**Slika 4.69.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crne strelice pokazuju umerenu reepitelizaciju koja obuhvata između 1/3 i 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice označavaju makrofage, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, dok crne strelice pokazuju edem; H&E bojenje, uveličanje 400x

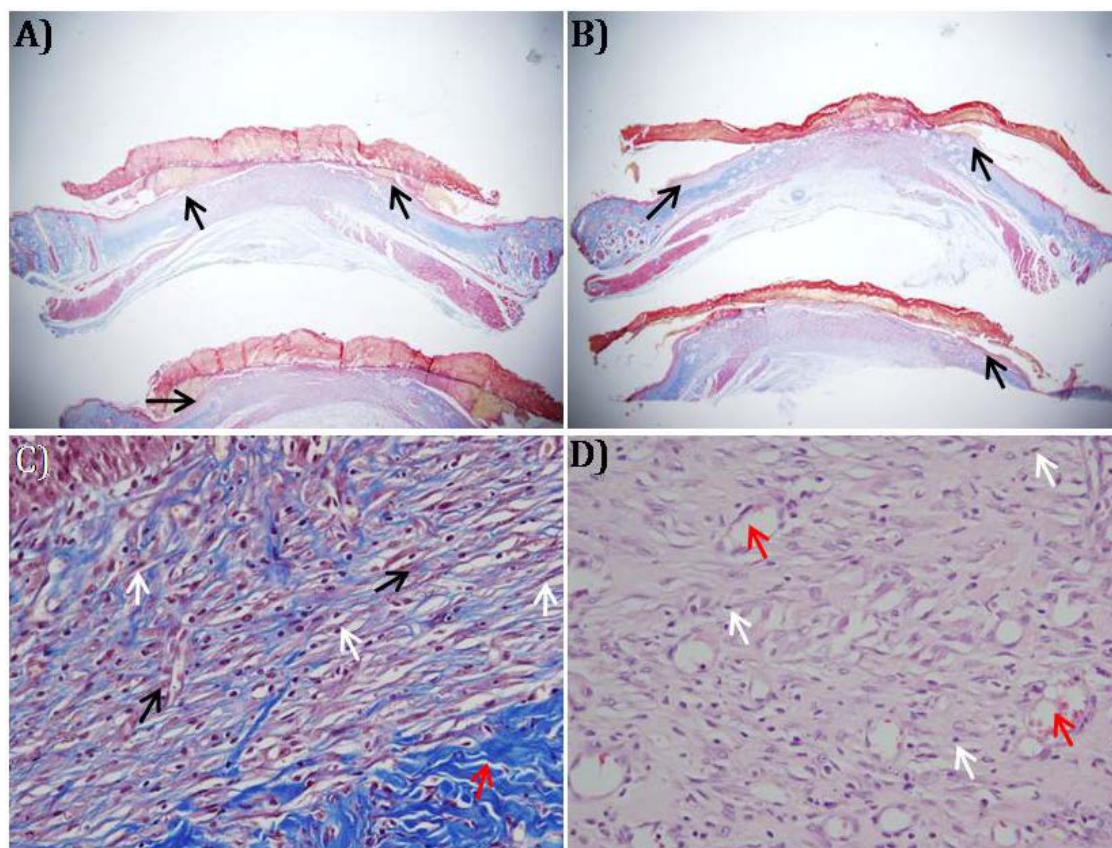


**Slika 4.70.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2): A) uzorak sa izraženom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine; Masono trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) uzorak sa umerenom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata između 1/3 i 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; C) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice označavaju makrofage, dok bela strelica pokazuje reepitelizaciju pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, dok crne strelice pokazuju edem; H&E bojenje, uveličanje 400x



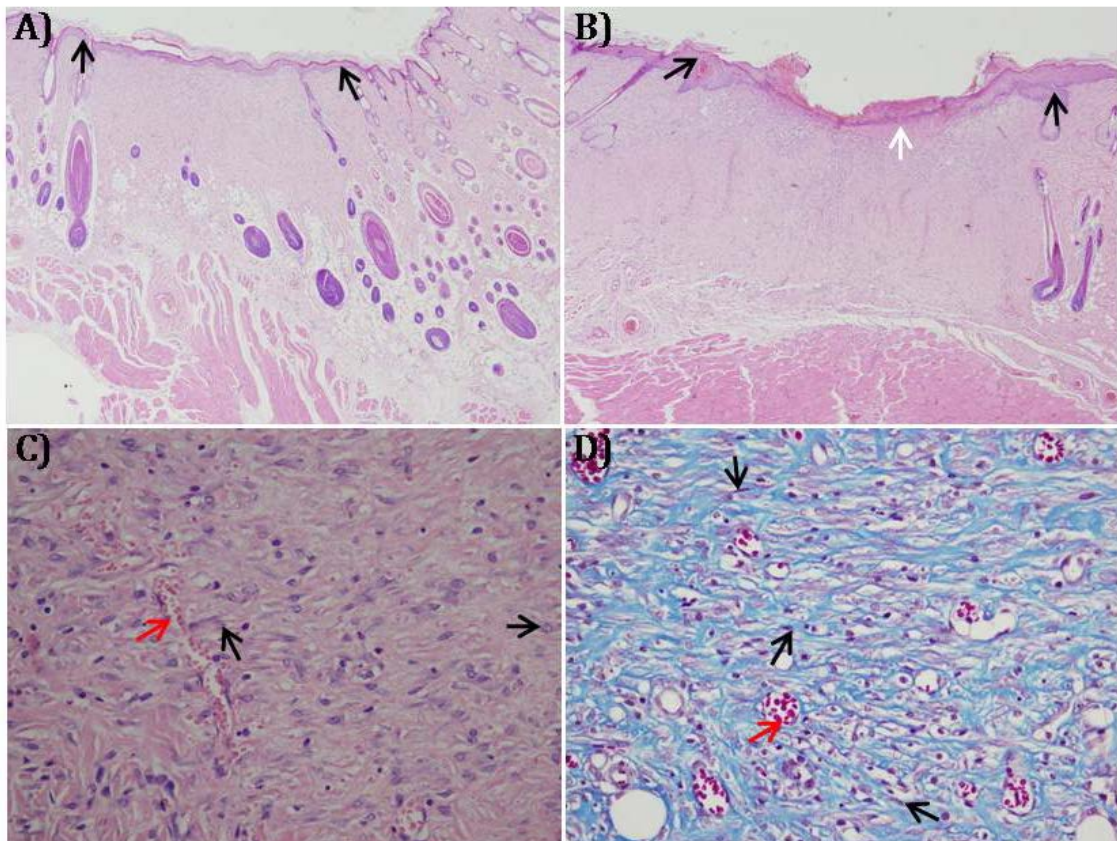


**Slika 4.71.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane vlažnim mikrovlaknima (G3): A) uzorak sa izraženom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) uzorak sa umerenom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata između 1/3 i 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; C) crne strelice označavaju makrofage, bele strelice označavaju fibroblaste, dok crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvena strelica reepitelizaciju, dok crna strelica pokazuje edem; H&E bojenje, uveličanje 400x

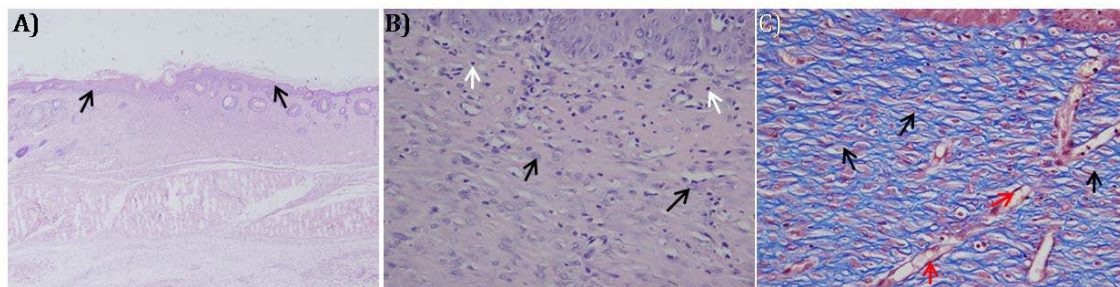


**Slika 4.72.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim mikrovlaknima (G4): A) uzorak sa izraženom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) uzorak sa umerenom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata između 1/3 i 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; C) crne strelice označavaju makrofage, bele strelice označavaju fibroblaste, dok crvena strelica pokazuje edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) bele strelice označavaju neutrofile, crvene strelice pokazuju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x

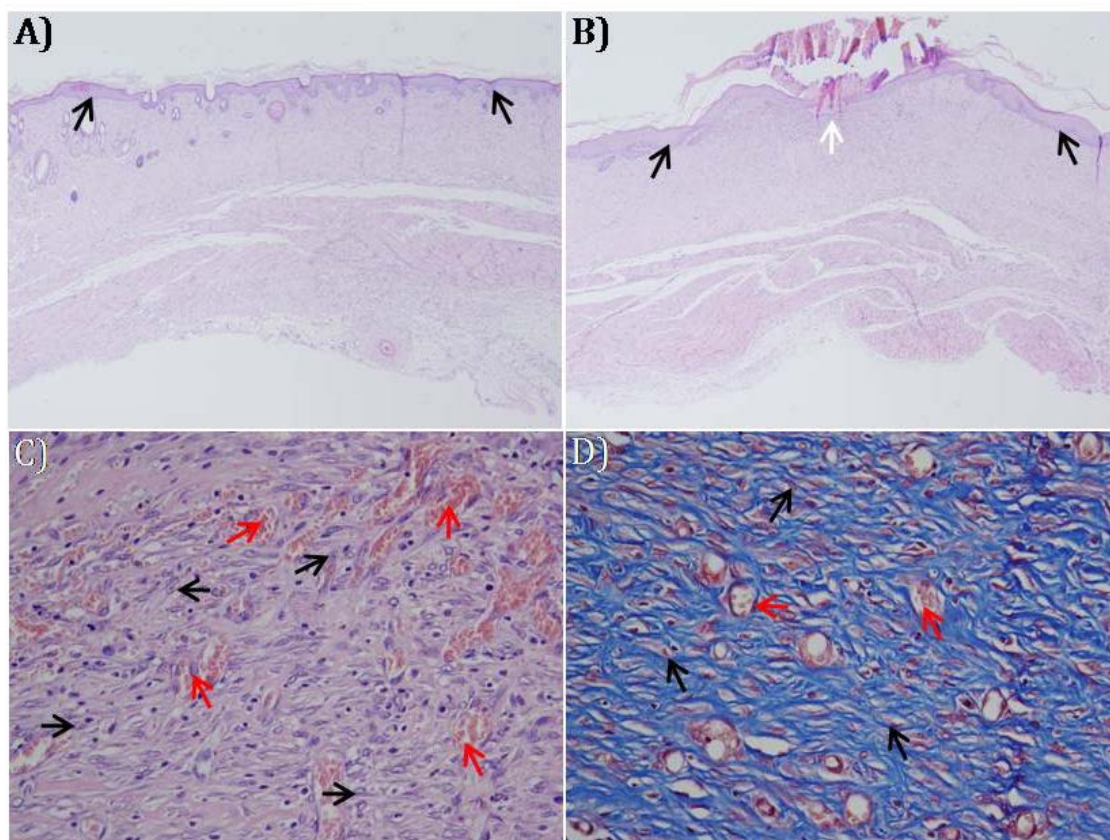
Na slikama 4.73, 4.74, 4.75 i 4.76 su prikazani reprezentativni histopatološki nalazi preseka kože 19 dana nakon indukovanja opekotine različitih grupa gde se mogu uočiti retki neutrofil, makrofagi, fibroblasti, reepitelizacija i angiogeneza, kao i kolagena vlakna. Histopatološka analiza preseka kože je pokazala prisustvo retkih neutrofila u subepidermalnoj regiji u grupama G1, G2 i G3, dok kod životinja iz grupe G4 nisu uočeni (tabela 4.8). Takođe se makrofagi uočavaju kod svih ispitivanih grupa, ali su manje brojni u grupi G4 u odnosu na ostale grupe. Veliki broj fibroblasta se uočava u svim ispitivanim grupama, ali je količina novostvorenog kolagena nešto manja u grupi G3 u odnosu na grupe G2 i G4. U svim analiziranim uzorcima kože životinja u grupama G2 i G3 postoji laka do umerena angiogeneza, u grupi G4 je lakostepena, a u kontrolnoj grupi G1 se uočava umerena angiogeneza kod 2 od 3 životinje, dok je kod jedne životinje bila izražena. Reepitelizacija je potpuna kod svih životinja iz grupe G2 i G4, dok je to slučaj kod 2 od 3 životinje u grupama G1 i G3. Kod po jedne životinje iz grupa G1 i G3 reepitelizacija je izražena i obuhvata više od 2/3 površine opekotine.



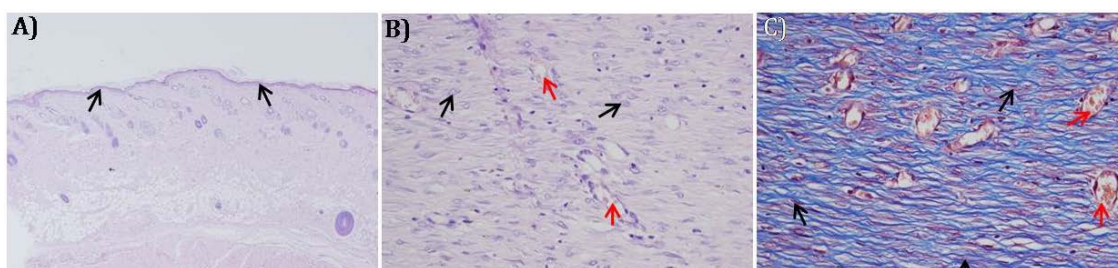
**Slika 4.73.** Histopatološki nalaz kože 19 dana nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) uzorak sa potpunom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) uzorak sa izraženom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju izraženu reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine, bela strelica pokazuje subepidermalni infiltrat od neutrofila; H&E bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, crvena strelica novostvoreni krvni sud pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.74.** Histopatološki nalaz kože 19 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2): A) crne strelice pokazuju potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crne strelice označavaju makrofage, bele strelice retke neutrofile u subepidermalnoj regiji; H&E bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice novostvorene krvne sud pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.75.** Histopatološki nalaz kože 19 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane vlažnim mikrovlaknima (G3): A) uzorak sa potpunom reepitelizacijom: crne strelice pokazuje potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) uzorak sa izraženu reepitelizacijom: crna strelica pokazuje izraženu reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine, bela strelica pokazuje subepidermalni infiltrat od neutrofila; H&E bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvene strelice pokazuju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.76.** Histopatološki nalaz kože 19 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim mikrovlaknima (G4): A) crne strelice pokazuju potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crne strelice označavaju makrofage, crvene strelice pokazuju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x

U tabeli 4.8 su sumirani rezultati histopatološke analize uzoraka tkiva kože životinja iz svih grupa odnosno opečenih netretiranih životinja (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2), tretiranih vlažnim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3), i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G4).

**Tabela 4.8.** Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize uzoraka tkiva kože opečenih netretiranih životinja (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2), tretiranih vlažnim Ag/alginatnim mikrovlačkama (G3) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlačkama (G4)

Vreme (dan)	Parametar	G1	G2	G3	G4
4	Broj životinja	3	3	3	3
	Reepitalizacija	0	0(0-1)+	1(0-1)+	1+ <sup>*c</sup>
	Angiogeneza	0,5(0-1)+	1(0-1)+	1+	1+
	Edem	2+	3+ <sup>*a</sup>	3+ <sup>*b</sup>	3+ <sup>*c</sup>
	Fibroblasti	0	0	0	0(0-1)+
	Makrofagi	0,5(0-1)+	0(0-1)+	0(0-1)+	1(0-1)+
	Subepidermalni neutrofilni	3+	3+	3+	3+
11	Broj životinja	3	3	3	3
	Reepitalizacija	1(1-3)+	2(2-3)+	2(2-3)+	2(2-3)+
	Angiogeneza	3+	3+	3+	3+
	Edem	1+	1+	1(1-2)+	1+
	Fibroblasti	1(1-2)+	2+	1+	1+ <sup>*d</sup>
	Makrofagi	3	2(1-2)+	3(2-3)+	2+
	Subepidermalni neutrofilni	2(2-3)3+	2+	2(1-2)+	1(1-2)+
19	Broj životinja	3	3	3	3
	Reepitalizacija	3+	3+	3+	3+
	Angiogeneza	2(2-3)+	2(1-2)+	1(1-2)+	1(0-1)+
	Edem	0	0	0	0
	Fibroblasti	3(2-3)+	3+	3(2-3)+	3(2-3)+
	Makrofagi	2(2-3)+	3+	2(1-2)+	1(0-1)+
	Subepidermalni neutrofilni	1+	1(0-1)+	1(0-1)+	0

<sup>\*a</sup> značajana razlika između grupa G1 i G2 ( $p < 0,05$ ), <sup>\*b</sup> značajana razlika između grupa G1 i G3 ( $p < 0,05$ ), <sup>\*c</sup> značajana razlika između grupa G1 i G4 ( $p < 0,05$ ), <sup>\*d</sup> značajana razlika između grupa G2 i G4 ( $p < 0,05$ ). p je izračunato Man-Vitni (*Mann-Whitney*) testom. Subepidermalni neutrofilni, angiogeneza, edem, gustina

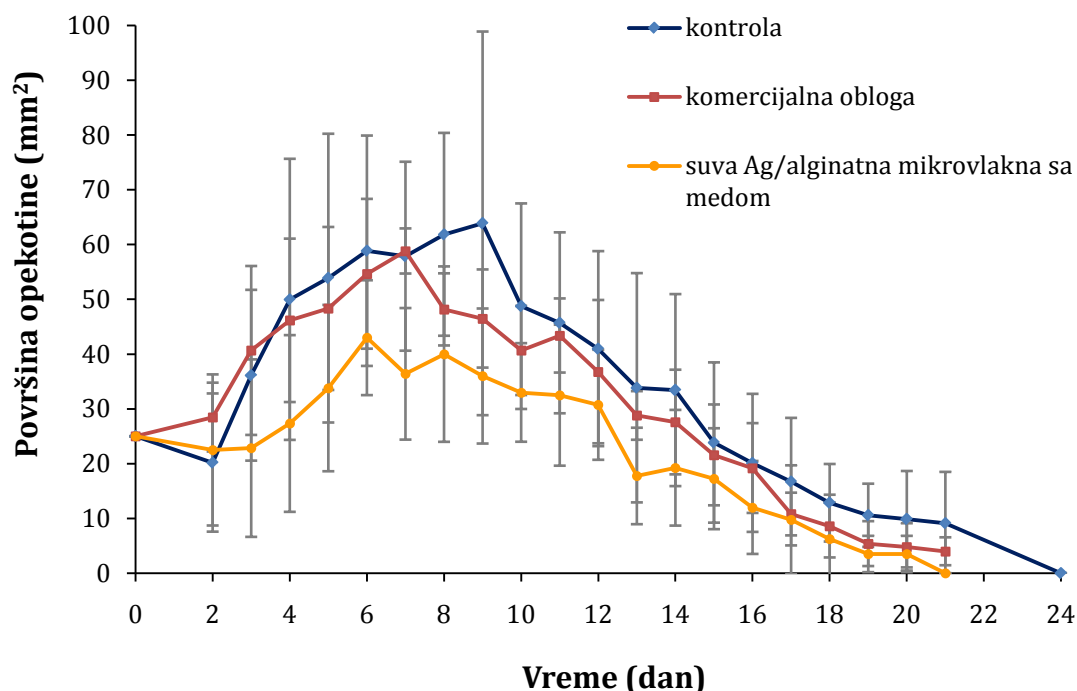


fibroblasta i makrofaga su procenjivani prema procentu njihovih gustina na 40x uvećanoj zoni opekotine. Skorovanje pomenutih parametara se određivalo na sledeći način: 0 - između 0 i 10%; 1 - između 10 i 40%; 2 - između 40 i 70% i 3 - između 70 i 100%. Trajanje reepitelizacije je procenjivano na 40x uvećanim sekcijama. Skorovanje je bilo 0 - kada nije bilo reepitelizacije, 1 - kada je reepitelizovalo do 1/3 opečene površine, 2 - kada je reepitelizovalo do 2/3 opečene površine, 3 - kada je reepitelizovalo više od 2/3 opečene površine.

#### 4.4.2 ISPITIVANJA EFIKASNOSTI Ag/ALGINATNIH MIKROVLAKANA SA MEDOM NA ZARASTANJE OPEKOTINA II STEPENA KOD MIŠEVA

Efikasnost Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom je ispitana *in vivo* na opekotinama II stepena kod miševa pri čemu su suva Ag/alginatna mikrovlakna sa medom upoređena sa komercijalnom oblogom za rane i netretiranom kontrolnom grupom (G1). Mikrovlakna korišćena u ovoj studiji su opisana u poglavlju 4.2.6, pri čemu je koncentracija nanočestica iznosila  $1,2 \pm 0,1$  mM. Komercijalna obloga za rane korišćena u ovoj studiji je na bazi suvih Ca-alginatnih mikrovlaknima (prečnika  $20 \pm 4$   $\mu$ m) koja su potopljena u kestenov med. Nakon indukovanja opekotine, rane su svakodnevno tretirane u grupi G2 sa  $84 \pm 7$  mg komercijalne obloge, a u grupi G3 sa  $6,2 \pm 1,1$  mg suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom. Tokom ispitivanja, sve životinje su se ponašale normalno i nije detektovana infekcija u ranama bilo makroskopski bilo mikroskopski.

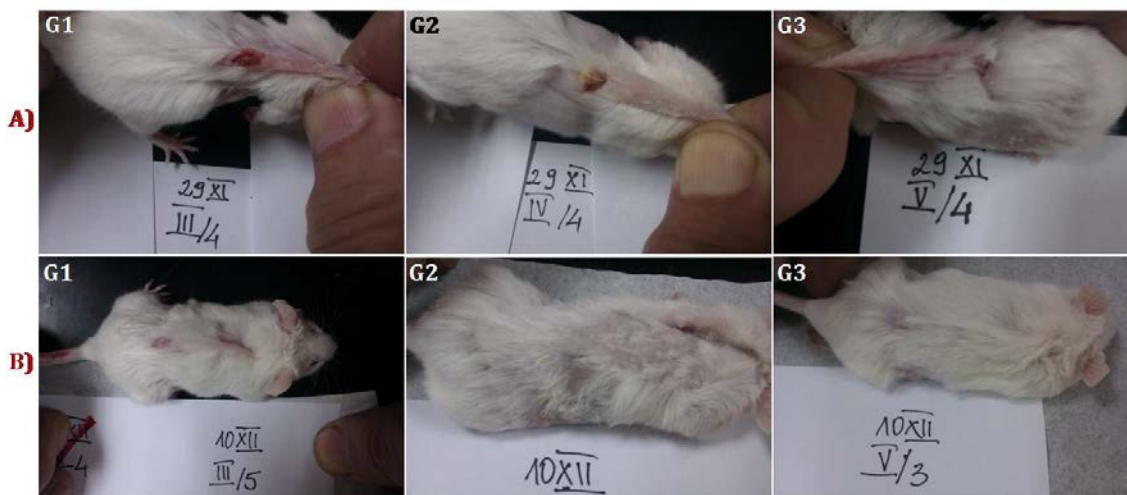
Na slici 4.77 je prikazana zavisnost površine opekotine od vremena za sve tri ispitivane grupe gde se na osnovu kontrakcije rane procenjuje ozdravljenje rane.



**Slika 4.77.** Zavisnost površine opekotine II stepena od vremena za kontrolnu grupu (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupu tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) (eksperimentalno dobijeni podaci su srednja vrednost najmanje 4 merenja)

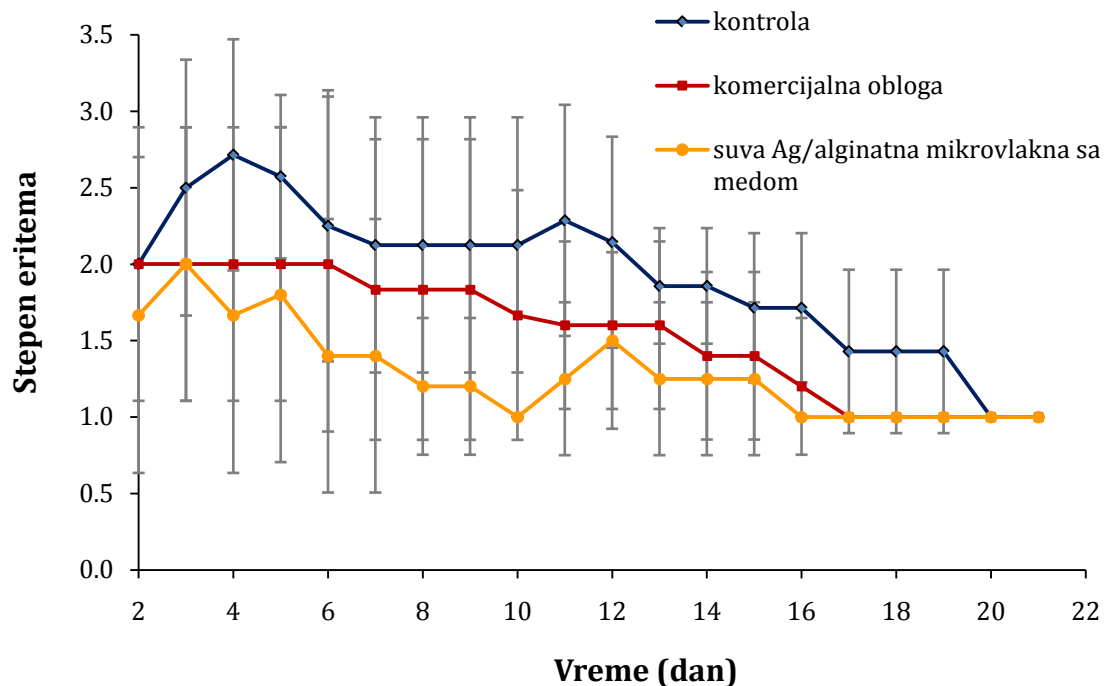
Nakon izazivanja opekotine kod većine miševa, vidljive rane su se pojavile posle 2-3 dana, a zatim su se postepeno uvećavale u svim ispitivanim grupama. Tako je u grupi G3 maksimalna veličina rane od  $43 \pm 10 \text{ mm}^2$  dostignuta nakon 6 dana od indukcije opekotine, dok je u grupi G2 ta vrednost dostignuta nakon 7 dana i iznosila je  $58,5 \pm 4,5 \text{ mm}^2$ . U kontrolnoj grupi G1 maksimalna površina rane od  $63,9 \pm 35 \text{ mm}^2$  je dostignuta posle 9 dana od indukcije opekotine. Kada su rane dostigle maksimalnu površinu počele su postepeno da se kontrahuju u svim grupama sve dok potpuno nisu zarasle 21-og dana u grupama G2 i G3, dok je u grupi G1 do potpunog zarastanja došlo nakon 24 dana od indukcije. Iako se i u ovom slučaju može uočiti da dobijeni rezultati nisu statistički značajno različiti, nešto brže zarastanje uz najmanje površine rana je dobijeno u grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3). Na slici 4.78 je prikazana klinička evaluacija ozdravljenja opekotina drugog stepena kod mužjaka *Mus musculus* miševa u kontrolnoj grupi (G1), grupi tretiranoj komercijalnom

Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2), i grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3).



**Slika 4.78.** Klinička evaluacija ozdravljenja opekotina drugog stepena kod mužjaka *Mus musculus* miševa u kontrolnoj grupi (G1), grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2), i grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3): A) termičke lezije 10 dana nakon izazivanja opekotine; B) termičke lezije 21 dan nakon izazivanja opekotine

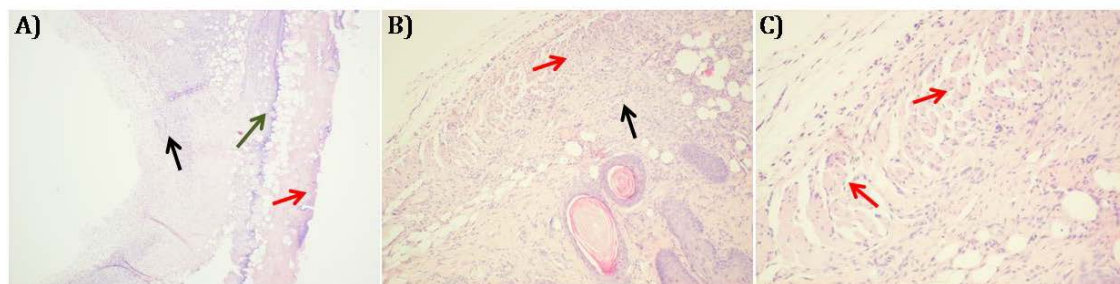
U svim ispitivanim grupama je takođe praćen i stepen eritema koji je vrednovan ocenama i to od 1-3: 1-bleda rana, 2-bleda rana sa crvenilom u sredini, 3-crvena rana (slika 4.79). I ovde rezultati nisu statistički značajno različiti, ali se može zapaziti da rana postaje bleđa nakon 16 i 17 dana od indukcije opekotine u grupama G3 i G2, redom, dok u kontrolnoj grupi G1 ona postaje bleđa posle 20 dana od indukcije opekotine.



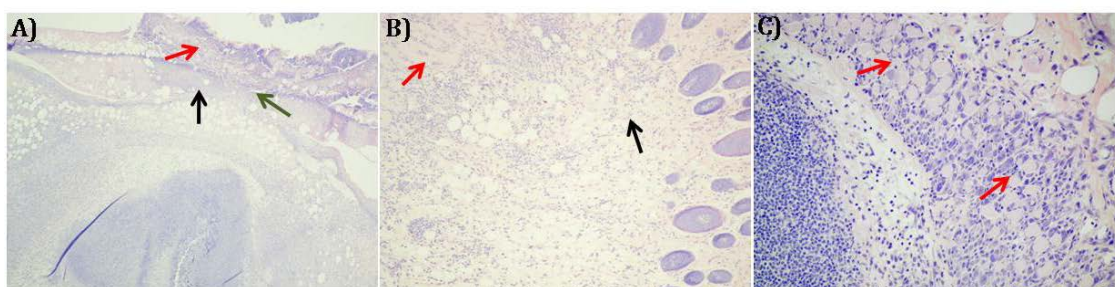
**Slika 4.79.** Zavisnost stepena eritema od vremena za kontrolnu grupu (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupu tretiranu Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) (eksperimentalno dobijeni podaci su srednja vrednost najmanje 4 merenja)

Makroskopski dobijeni podaci su potkrepljeni i rezultatima histopatološke analize.

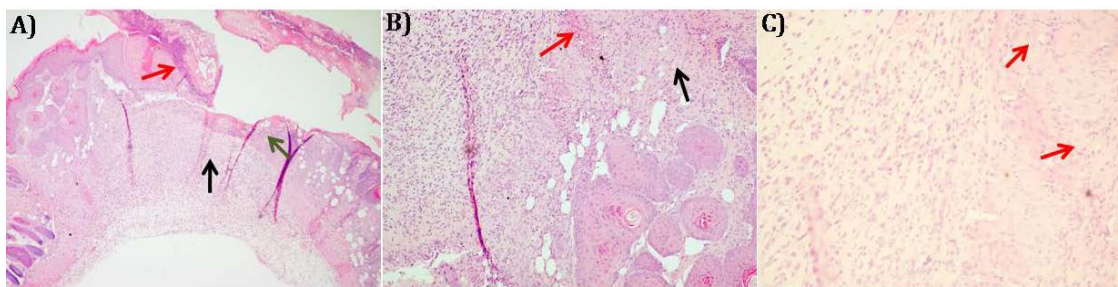
Na slikama 4.80, 4.81 i 4.82 su prikazani reprezentativni histopatološki nalazi preseka kože nakon 10 dana od indukcije opekotine kod različitih grupa gde se mogu uočiti krusta, neutrofilni limfociti, makrofagi, skeletna mišićna vlakna, fibroblasti, novostvoreni krvni sudovi, kao i kolagena vlakna. Histopatološka analiza preseka kože ukazuje da nema značajnih razlika između ispitivanih grupa. Tako se na površini opekotine kod svih ispitivanih grupa nalazi nekrotični epidermis i dermis sa neutrofilima. U dermisu ispod kruste uočava se inflamatorni infiltrat organizovan u dva sloja: i) prvi sloj je sačinjen od neutrofila, i ii) drugi sloj je sačinjen od limfocita, neutrofila i makrofaga. Takođe, se u dermisu uočava granulaciono tkivo, što odgovara proliferativnoj fazi zarastanja rane. U sloju skeletnih mišića uočavaju se mišićna vlakna u regeneraciji.



**Slika 4.80.** Histopatološki nalaz kože nakon 10 dana od indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crvena strelica označava krustu, zelena strelica označava prvi sloj inflamatornog infiltrata od neutrofila, dok crna strelica označava drugi sloj inflamatornog infiltrata od limfocita, neutrofila i makrofaga; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crna strelica označava granulaciono tkivo, dok crvena strelica označava skeletna mišićna vlakna u regeneraciji; H&E bojenje, uveličanje 100x; C) crvene strelice označavaju regeneraciju skeletnih mišićnih vlakana; H&E bojenje, uveličanje 200x

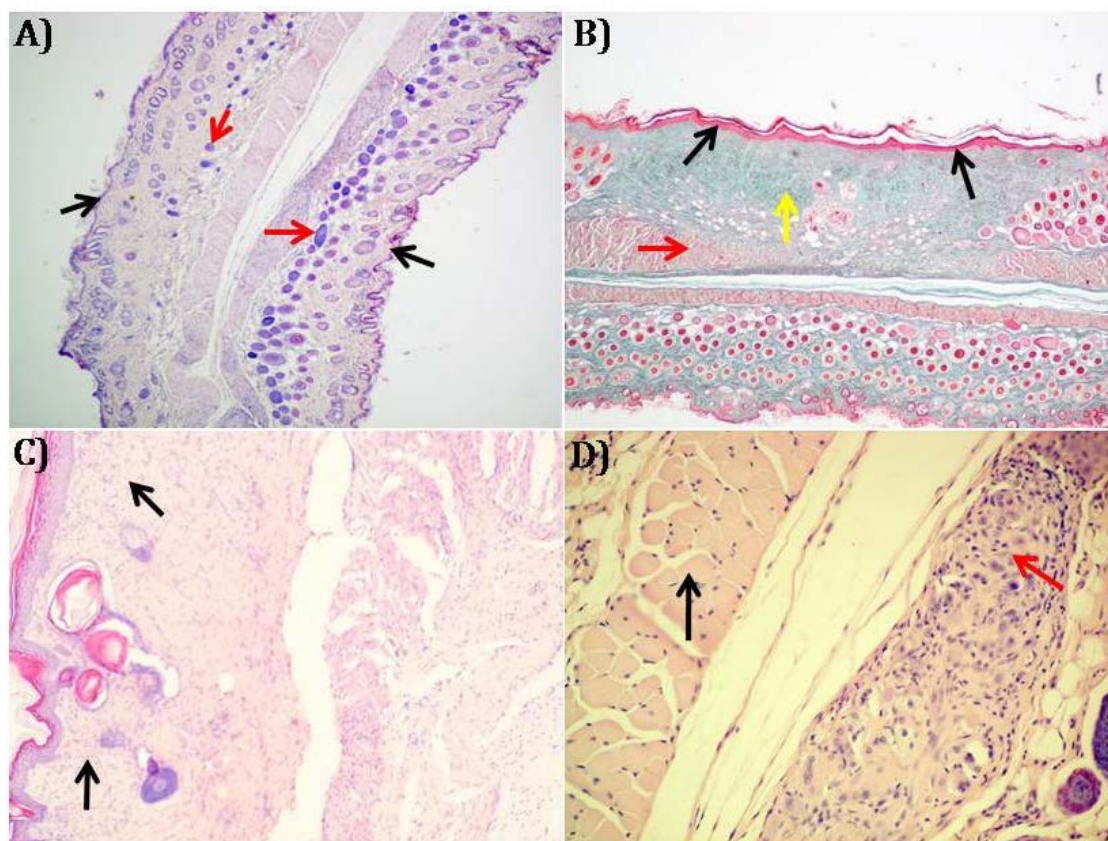


**Slika 4.81.** Histopatološki nalaz kože nakon 10 dana od indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2): A) crvena strelica označava krustu, zelena strelica označava prvi sloj inflamatornog infiltrata od neutrofila, dok crna strelica označava drugi sloj inflamatornog infiltrata od limfocita, neutrofila i makrofaga; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crna strelica označava granulaciono tkivo, dok crvena strelica označava skeletna mišićna vlakna u regeneraciji; H&E bojenje, uveličanje 100x; C) crvene strelice označavaju regeneraciju skeletnih mišićnih vlakana; H&E bojenje, uveličanje 200x

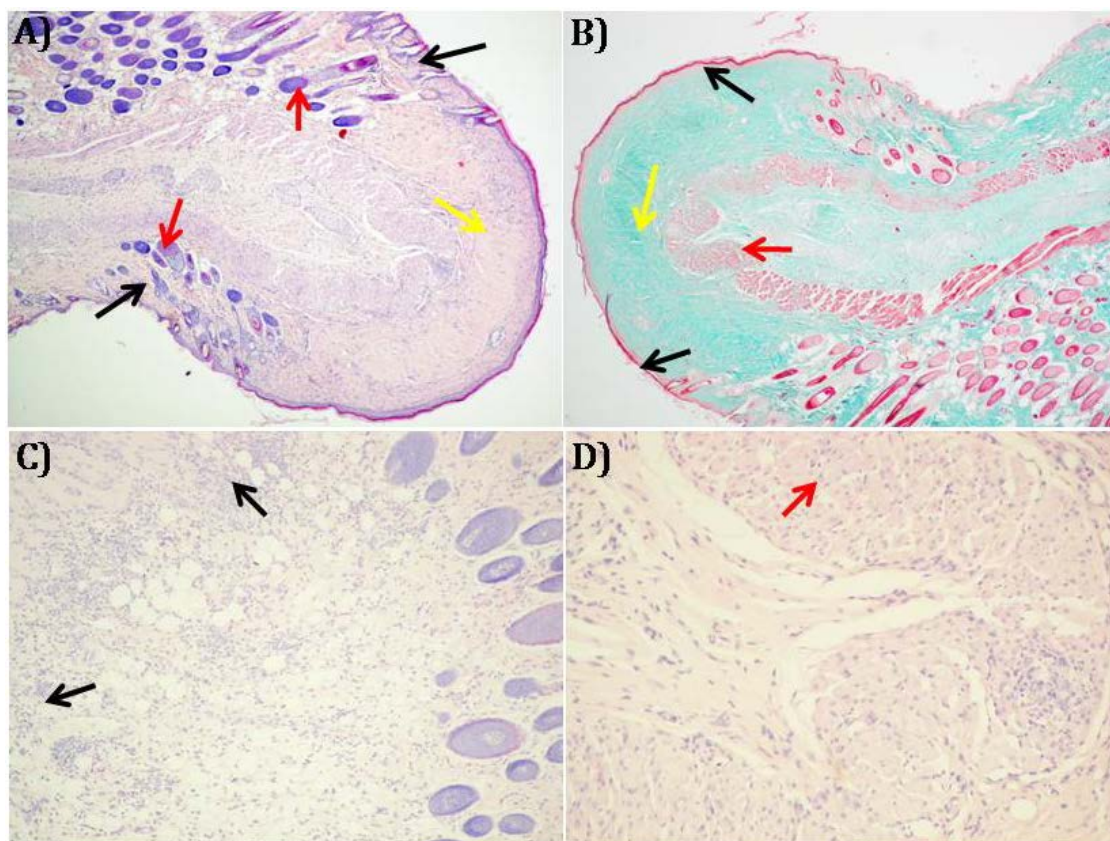


**Slika 4.82.** Histopatološki nalaz kože nakon 10 dana od indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3): A) crvena strelica označava krustu, zelena strelica označava prvi sloj inflamatornog infiltrata od neutrofila, dok crna strelica označava drugi sloj inflamatornog infiltrata od limfocita, neutrofila i makrofaga; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crna strelica označava granulaciono tkivo, dok crvena strelica označava skeletna mišićna vlakna u regeneraciji; H&E bojenje, uveličanje 100x; C) crvene strelice označavaju regeneraciju skeletnih mišićnih vlakana; H&E bojenje, uveličanje 200x

Na slikama 4.83, 4,84 i 4.85 su prikazani reprezentativni histopatološki nalazi preseka kože 21 dan nakon indukcije opekotine kod različitih grupa gde se mogu uočiti ožiljak, reepitelizacija, inflamatorne ćelije, kolagena vlakna, kao i skeletna mišićna vlakna. Histopatološka analiza isečaka tkiva kože životinja iz sve tri ispitivane grupe ukazuje na postojanje ožiljka kod svih životinja. Na mestima ožiljaka uočava se potpuna reepitelizacija sa tanjim epidermisom u odnosu na epidermis normalne kože, dermis koji je izgrađen od gustog vezivnog tkiva, kao i nedostatak folikula dlaka. Takođe, u svim ispitivanim grupama u dermisu se uočavaju inflamatorne ćelije s'tim da je kod grupe G2 prisutan veoma intenzivni zapaljenski infiltrat, kod grupe G3 lakostepeni zapaljenski infiltrat, dok se kod kontrolne grupe G1 uočavaju pojedinačni neutrofilni. Skeletna mišićna vlakna su u potpunosti regenerisana kod grupe G3, dok se kod grupa G1 i G2 i dalje uočava proces regeneracije.



**Slika 4.83.** Histopatološki nalaz kože nakon 21 dana od indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crne strelice označavaju kožu oko mesta povrede sa folikulima dlaka (crvene strelice); H&E bojenje, uveličanje 40x; B) ožiljak na mestima prethodno nanete povrede, crne strelice označavaju potpunu reepitelizaciju, crvena strelica pokazuje gusto vezivno tkivo dermisa pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju inflamatorne ćelije u dermisu; H&E bojenje, uveličanje 100x; D) crvene strelice označavaju skeletna mišićna vlakna u procesu regeneracije, crna strelica označava intaktna skeletna mišićna vlakna; H&E bojenje, uveličanje 200x



**Slika 4.84.** Histopatološki nalaz kože nakon 21 dana od indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2): A) žuta strelica označava ožiljka na mestima prethodno nanete povrede, crne strelice označavaju kožu oko mesta povrede sa folikulima dlaka (crvene strelice); H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crne strelice označavaju potpunu reepitelizaciju, žuta strelica pokazuje gusto vezivno tkivo dermisa, crvena strelica označava sloj skeletnih mišićnih vlakana, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju inflamatorne ćelije u dermisu; H&E bojenje, uveličanje 100x; D) crvena strelica označava skeletna mišićna vlakna u procesu regeneracije; H&E bojenje, uveličanje 200x





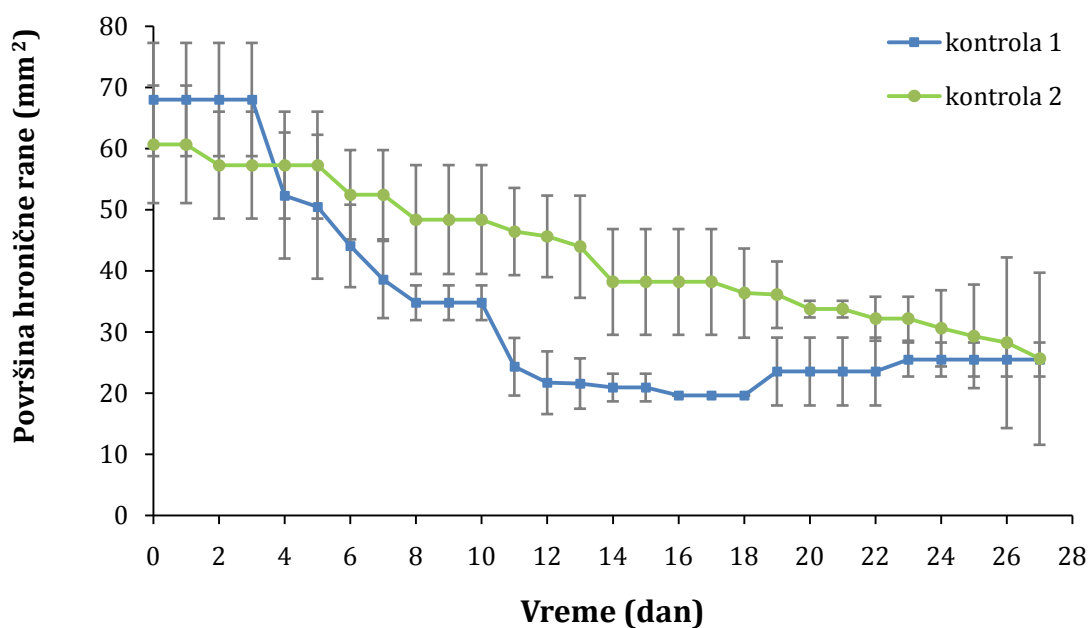
**Slika 4.85.** Histopatološki nalaz kože nakon 10 dana od indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3): A) žute strelice označavaju ožiljka na mestima prethodno nanete povrede, crne strelice označavaju kožu oko mesta povrede sa folikulima dlaka (crvene strelice); H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crne strelice označavaju potpunu reepitelizaciju, žuta strelica pokazuje gusto vezivno tkivo dermisa, crvene strelice označavaju potpuno formiran i diferenciran mišićni sloj, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju inflamatorne ćelije u dermisu, crvena strelica označava potpuno formiran i diferenciran mišićni sloj; H&E bojenje, uveličanje 100x

#### 4.4.3 UTICAJ Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITA NA ZARASTANJE HRONIČNIH RANA NA MODELU NEKROZE KOD PACOVA

U cilju ispitivanja potencijalne primene Ag/alginatnih nanokompozita u tretmanu hroničnih rana, makroskopski i mikroskopski je praćeno zarastanje rana na modelu nekroze kod pacova. Ispitivan je uticaj suvih Ag/alginatnih mikrovlakana, suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom, kao i komercijalne obloge na bazi Ca-alginatnih mikrovlakana sa jonskim srebrom i komercijalne obloge na bazi Ca-alginatnih mikrovlakana koja su uronjena u kestenov med. Rane kože hroničnog karaktera na pacovima su indukovane intradermalnim ubrizgavanjem doksorubicina (5 mg/ml). Rane su dostigle maksimalnu površinu oko 60 mm<sup>2</sup> nakon 14 dana od indukcije, a zatim su životinje podvrgnute tretmanu ispitivanim preparatima. Izvedene su dve eksperimentalne serije sa dve kontrolne grupe kod kojih su hronične rane samo dnevno ispirane fiziološkim rastvorom. U prvoj eksperimentalnoj seriji je ispitivana efikasnost suvih Ag/alginatnih mikrovlakana na zarastanje hroničnih rana i upoređena sa komercijalnom

Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom za rane i netretiranom kontrolnom grupom. U drugoj eksperimentalnoj seriji je ispitivana efikasnost suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom i upoređena sa komercijalnom Ca-alginatnom oblogom za rane sa medom i netretiranom kontrolnom grupom.

Na slici 4.86 je prikazana zavisnost površine hronične rane od vremena za dve netretirane kontrolne grupe kod kojih je praćen proces spontanog zarastanja rane. Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da maksimalna površina hronične rane koja je indukovana, iako nije statistički značajno različita, ipak nije ista kod dve ispitivane kontrolne grupe, gde je iznosila  $68 \pm 9,3 \text{ mm}^2$  kod prve i  $60,7 \pm 9,6 \text{ mm}^2$  kod druge kontrolne grupe. Nakon dostizanja maksimalne površine rane u obe kontrolne grupe došlo je do spontanog kontrakcije rana, pri čemu je nešto brza kontrakcija rane primećena kod kontrolne grupe 1. Na kraju ispitivanog perioda nije bilo statistički značajne razlike u površini rane između kontrolnih grupa ( $25,6 \pm 9 \text{ mm}^2$ ).



**Slika 4.86.** Zavisnost površine hronične rane od vremena za kontrolnu grupu 1 i kontrolnu grupu 2 (eksperimentalno dobijeni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja)

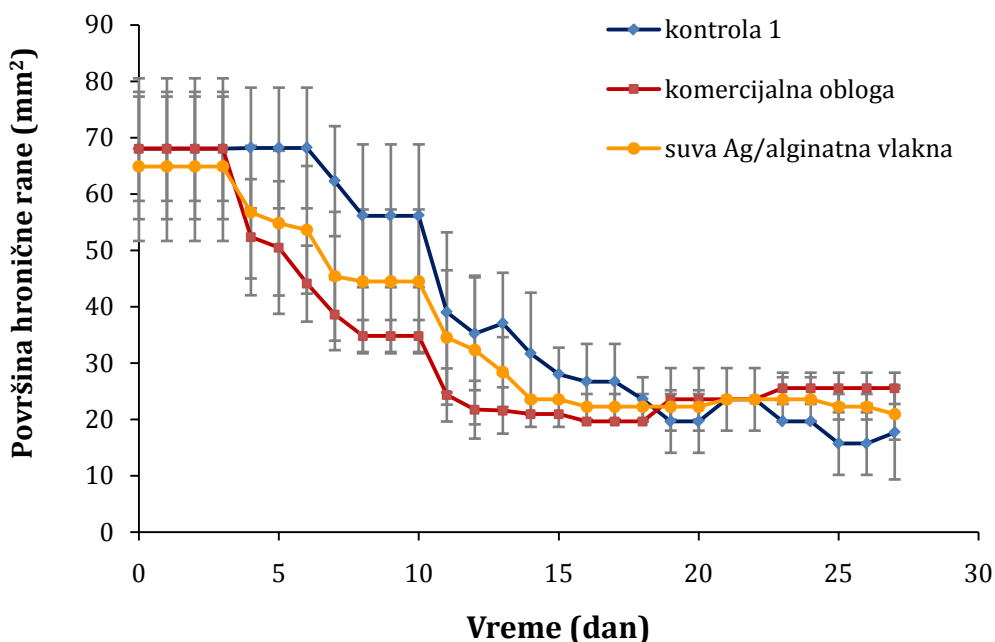
Dobijeni rezultati navode na zaključak da je model nekroze komplikovan i da proces razvijanja hronične rane nije dovoljno dobro kontrolisan što se odrazilo i na rezultate ispitivanih grupa.

#### 4.4.3.1 ISPITIVANJA EFIKASNOSTI SUVIH Ag/ALGINATNIH MIKROVLAKANA NA MODELU NEKROZE KOD PACOVA

U prvoj eksperimentalnoj seriji suva Ag/alginatna mikrovlakna su upoređena sa komercijalnom oblogom za rane i netretiranom kontrolnom grupom 1 (slika 4.86). Mikrovlakna korišćena u ovoj studiji su opisana u poglavlju 4.2.5 i imala su koncentraciju nanočestica srebra od  $0,6 \pm 0,06$  mM. Komercijalna obloga za rane korišćena u ovoj studiji je na bazi suvih Ca-alginatnih mikrovlakana (prečnika  $15 \pm 4$   $\mu$ m) i jona srebra u koncentracij od  $7,24 \pm 0,37$  mas.%, kao i u eksperimentu opekotine na pacovima (poglavlje 4.4.1.2). Nakon dostizanja maksimalne površine rane posle 14 dana od indukovanja, hronične rane su svakodnevno tretirane u grupi G2 sa  $17,6 \pm 2,6$  mg komercijalne obloge, a u grupi G3 sa  $11,1 \pm 1,0$  mg suvih Ag/alginatnih mikrovlakana. Tokom ispitivanja, sve životinje su se ponašale normalno, ali je detektovana infekcija u ranama kod određenih životinja iz grupa G1 i G2. Tako je kod jedne životinje iz kontrolne grupe G1 nakon 19 dana tretmana hronične lezije, makroskopski uočena infekcija rane, a mikrobiološkom analizom je potvrđeno prisutvo mešovite infekcije (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Klebsiella* spp.), dok je kod jedne životinje iz iste grupe uočena infekcija nakon 28 dana tretmana histopatološkom analizom. Takođe, infekcija rane je makroskopski uočena i kod jedne životinje iz grupe G2 nakon 28 dana tretmana hronične lezije. Mikrobiološkom analizom je i u ovom slučaju potvrđeno prisutvo mešovite infekcije (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Klebsiella* spp.).

Za procenu zarastanja hroničnih rana praćena je zavisnost površine hronične rane od vremena za sve tri ispitivane grupe (slika 4.87). Nakon 14 dana od indukcije hronične lezije u sve tri grupe dostignuta je maksimalna veličina rane tako da je u grupi G1 njena vrednost iznosila  $68 \pm 12,5$  mm<sup>2</sup>, u grupi G2  $68 \pm 9,3$  mm<sup>2</sup> i u grupi G3  $64,9 \pm 12,3$  mm<sup>2</sup>. U tretiranim grupama veličina rane se

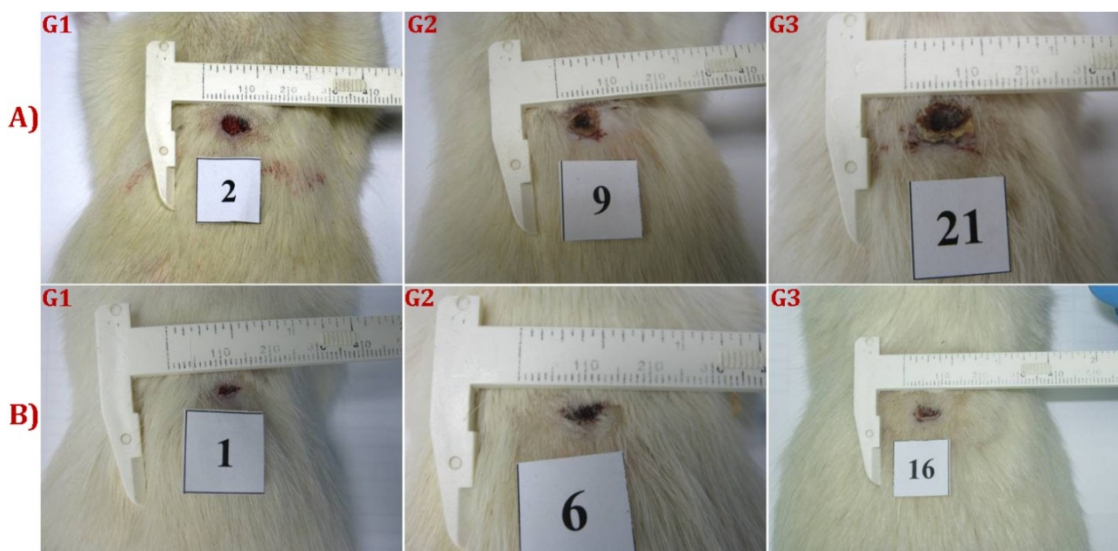
nije menjale sve do trećeg dana, a u kontrolnoj grupi G1 se nije menjala sve do šestog dana od početka tretmana hronične lezije. Zatim je u svim grupama došlo do postepene kontrakcije rane sve do kraja ispitivanog perioda.



**Slika 4.87.** Zavisnost površine hronične rane od vremena za kontrolnu grupu 1 (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskom srebrom (G2) i grupu tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) (eksperimentalno dobijeni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja)

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su površine rana sve do 18-og dana od početka tretmana hronične lezije bile manje u tretiranim grupama G2 i G3, u odnosu na netretiranu kontrolu G1, i to su bile manje u grupi koja je tretirana komercijalnom oblogom u odnosu na grupu tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima. Međutim, i ovde treba naglasiti da dobijeni rezultati nisu statistički značajno različiti tako da nakon 18 dana od indukcije lezije praktično nije bilo razlike u površini hroničnih rana između ispitivanih grupa i ta vrednost je iznosila  $21,3 \pm 5,5$  mm<sup>2</sup>.

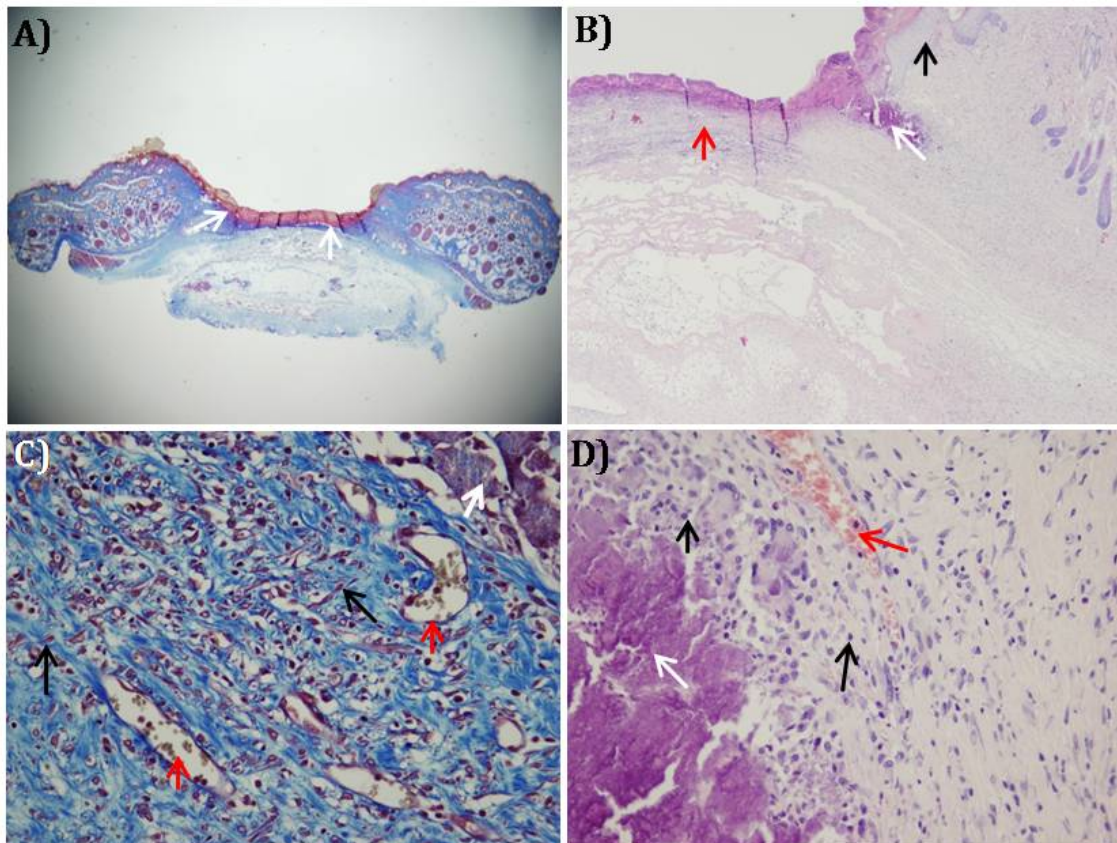
Na slici 4.88 je prikazana klinička evaluacija ozdravljenja hronične lezije kod mužjaka *Wistar* pacova nakon 14 i 28 dana tretmana.



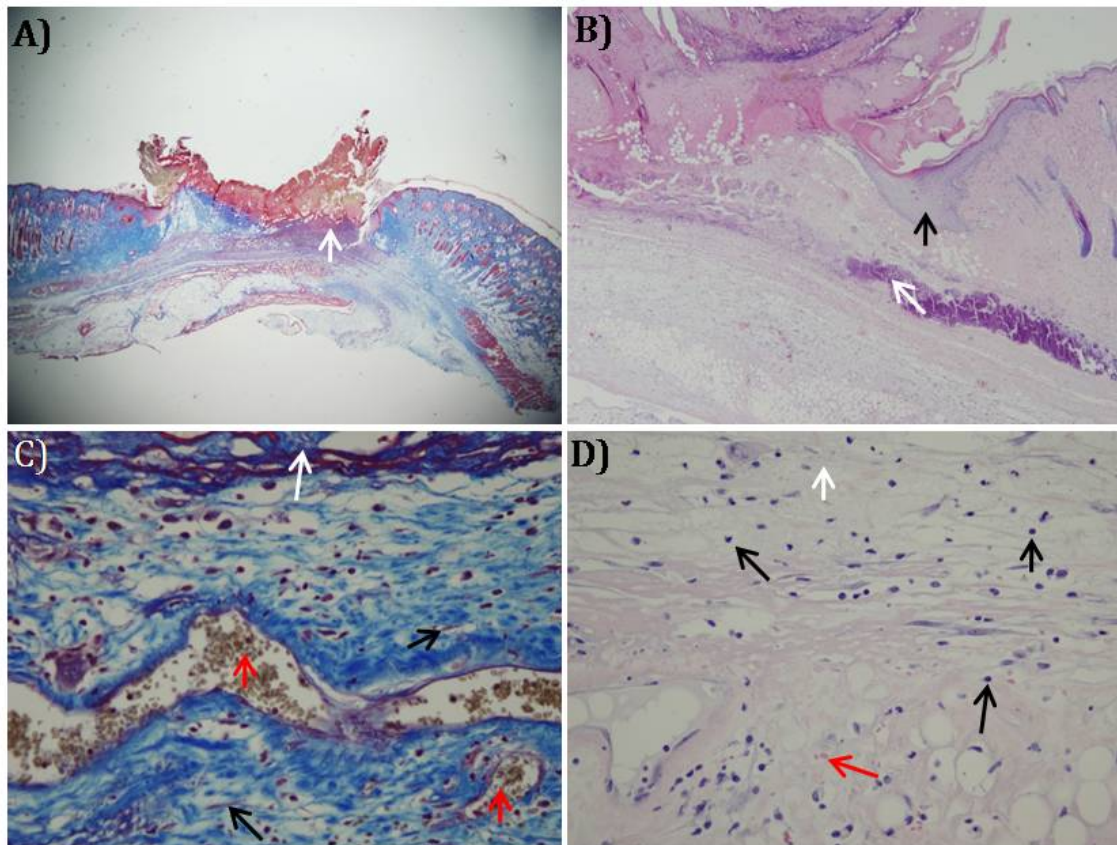
**Slika 4.88.** Klinička evaluacija ozdravljenja hronične rane kod mužjaka *Wistar* pacova u kontrolnoj grupi 1 (G1), grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3): A) hronična lezija nakon 14 dana tretmana; B) hronična lezije nakon 28 dana tretmana

Makroskopski dobijeni rezultati su potkrepljeni histopatološkom analizom.

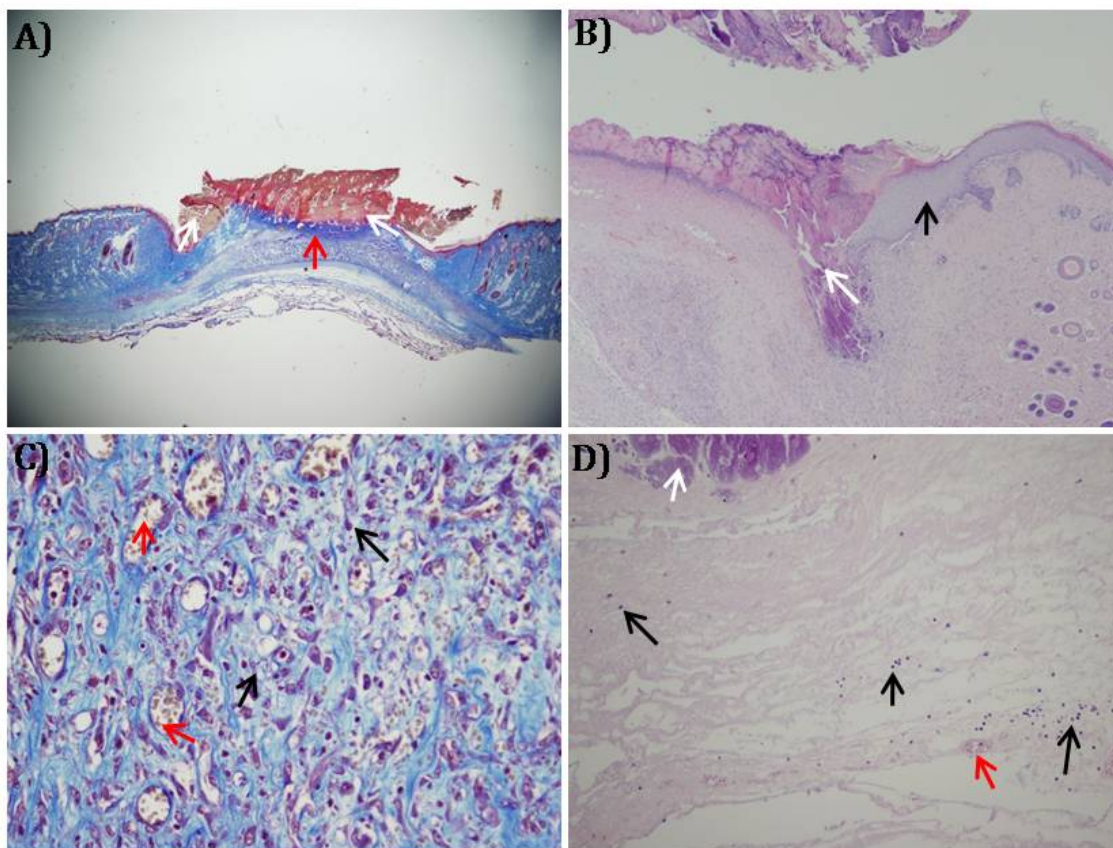
Na slikama 4.89, 4.90 i 4.91 su prikazani reprezentativni histopatološki preseki kože nakon 14 dana od početka tretmana hronične rane u različitim grupama gde se može uočiti izgled i veličina rane, granulaciono tkivo, neutrofil, kao i novostvoreni epitel. Histopatološka analiza preseka je pokazala da je maksimalni prečnik rane manji u tretiranim grupama G2 i G3 u odnosu na netretiranu kontrolu 1 (G1), ali razlika nije dostigla statističku značajnost (tabela 4.9). Uočava se da granulaciono tkivo popunjava defekt počev od ivice i dna rane. Zona granulacionog tkiva je značajno veća u tretiranim grupama, nego u kontrolnoj grupi 1 i ova razlika se pokazala statistički značajnom ( $p < 0,05$ ). U tkivu oko rane kod svih ispitivanih grupa se uočava infiltracija neutrofila, s tim da je kod životinja iz grupe G1 izražena, dok je kod životinja iz tretiranih grupa lako stepena. Zona novostvorenog epitela je šira u tretiranim grupama u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu, ali je ova razlika bila statistički značajna samo između grupa G2 i G1 ( $p < 0,05$ ).



**Slika 4.89.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 14 dana nakon početka tretmana hronične rane kod kontrolne grupe 1 (G1): A) bele strelice označavaju ranu; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) bela strelica označava ranu, crna strelica označava novostvoreni epitel, dok crvena strelica pokazuje granulaciono tkivo koje popunjava defekt; H&E bojenje, uveličanje 40x; C) bela strelica označava ranu koju od dna popunjava granulaciono tkivo sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvena strelica) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; D) bela strelica označava ranu, crne strelice označavaju neutrofile, dok crvena pokazuje novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.90.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 14 dana nakon početka tretmana hronične rane grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskom srebrom (G2): A) bela strelica označava ranu, Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) bela strelica označava ranu, crna strelica označava novostvoreni epitel, H&E bojenje, uveličanje 40x; C) bela strelica označava dno rane koje popunjava granulaciono tkivo sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvene strelice) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; D) bela strelica označava dno rane, crne strelice pokazuju neutrofile, dok crvena pokazuje novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.91.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 14 dana nakon početka tretmana hronične rane kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3): A) bele strelice označavaju ranu, dok crvena strelica pokazuje granulaciono tkivo; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) bela strelica označava ranu, crne strelica označava novostvoreni epitel; H&E bojenje, uveličanje 40x; C) granulaciono tkivo sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvene strelice) i kolagenih vlakana (plavo obojenje), Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) bela strelica označava ranu, crne strelice neutrofile, dok crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x

U tabeli 4.9 su sumirani rezultati histopatološke analize uzoraka kože nakon 14 dana od početka tretmana hronične lezije kod životinja iz svih grupa prve eksperimentalne serije odnosno kod netretiranih životinja kontrolne grupe 1 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3).

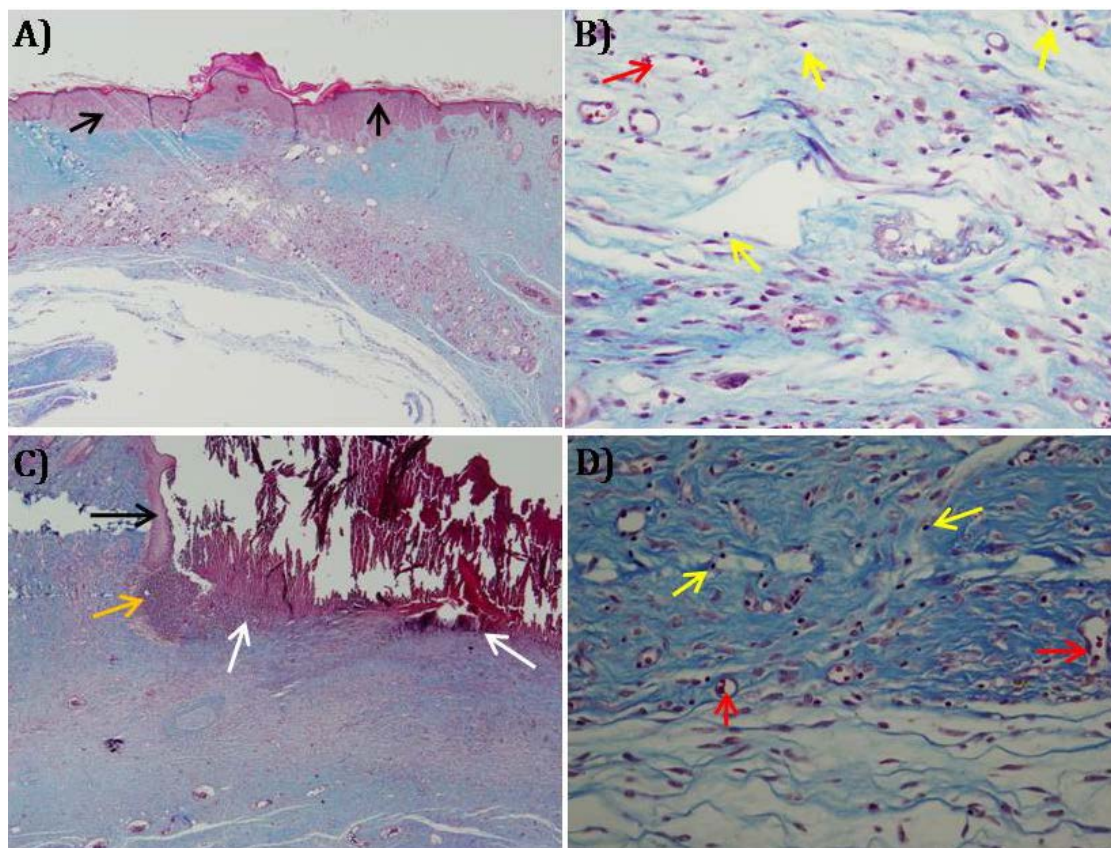


**Tabela 4.9.** Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože nakon 14 dana od početka tretmana hronične lezije netretiranih životinja kontrole 1 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3)

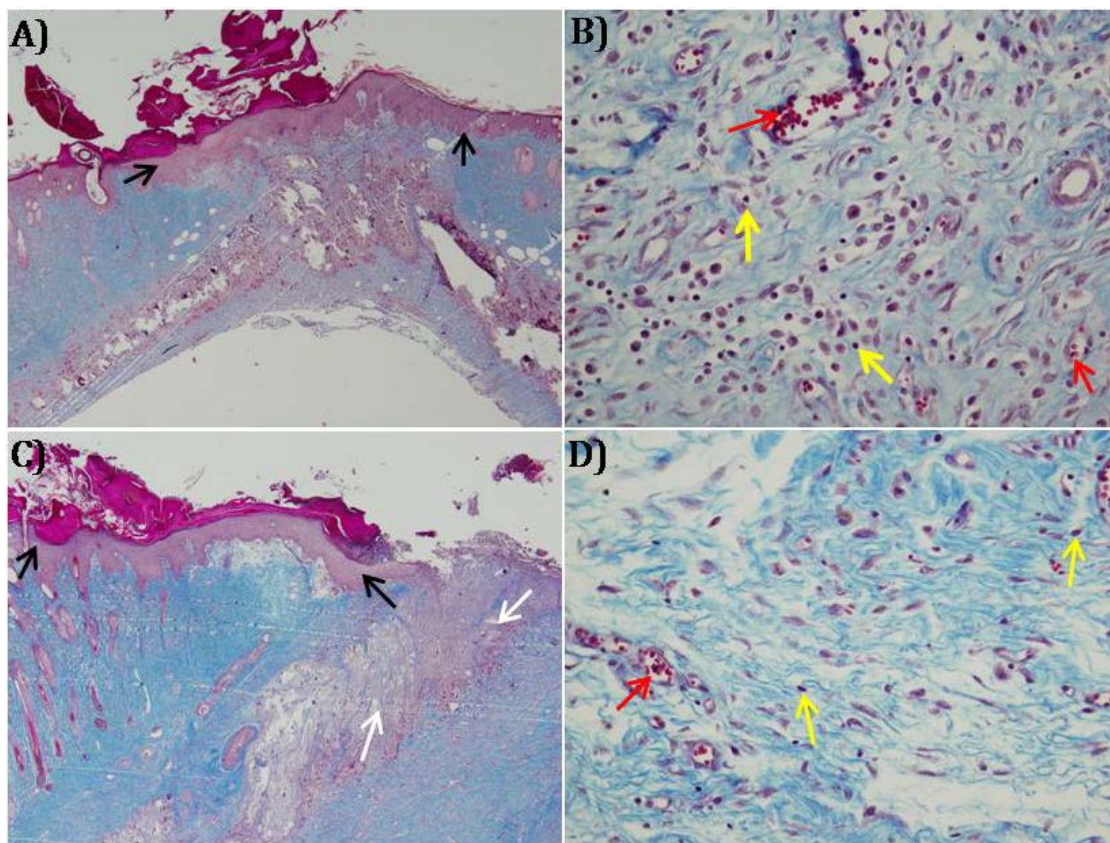
Parametar	Grupa			P
	G1	G2	G3	
Broj životinja	3	3	3	
Maksimalni prečnik ulceracije (mm)	6,9 ± 0,9	4,1 ± 1,7	5,4 ± 1,5	0,131
Debljina epitela na rubu ulceracije (µm)	289,9 ± 77,6	535,15 ± 97 <sup>*a</sup>	341,8 ± 90,2	0,033
Zona granulacionog tkiva (mm)	0,9 ± 0,28	1,63 ± 0,16 <sup>*a</sup>	1,9 ± 0,3 <sup>*b</sup>	0,011
Maksimalna širina zone novostvorenog epitela (mm)	1,5 ± 0,2	535 ± 96,8 <sup>*a</sup>	1,7 ± 0,5	0,032

p vrednosti su izračunate jednofaktorskim ANOVA testom; <sup>\*a</sup> razlika između grupa G1 i G2 (p<0,05); <sup>\*b</sup> razlika grupa G1 i G3 (p<0,05) naknadni test, Tukey HSD.

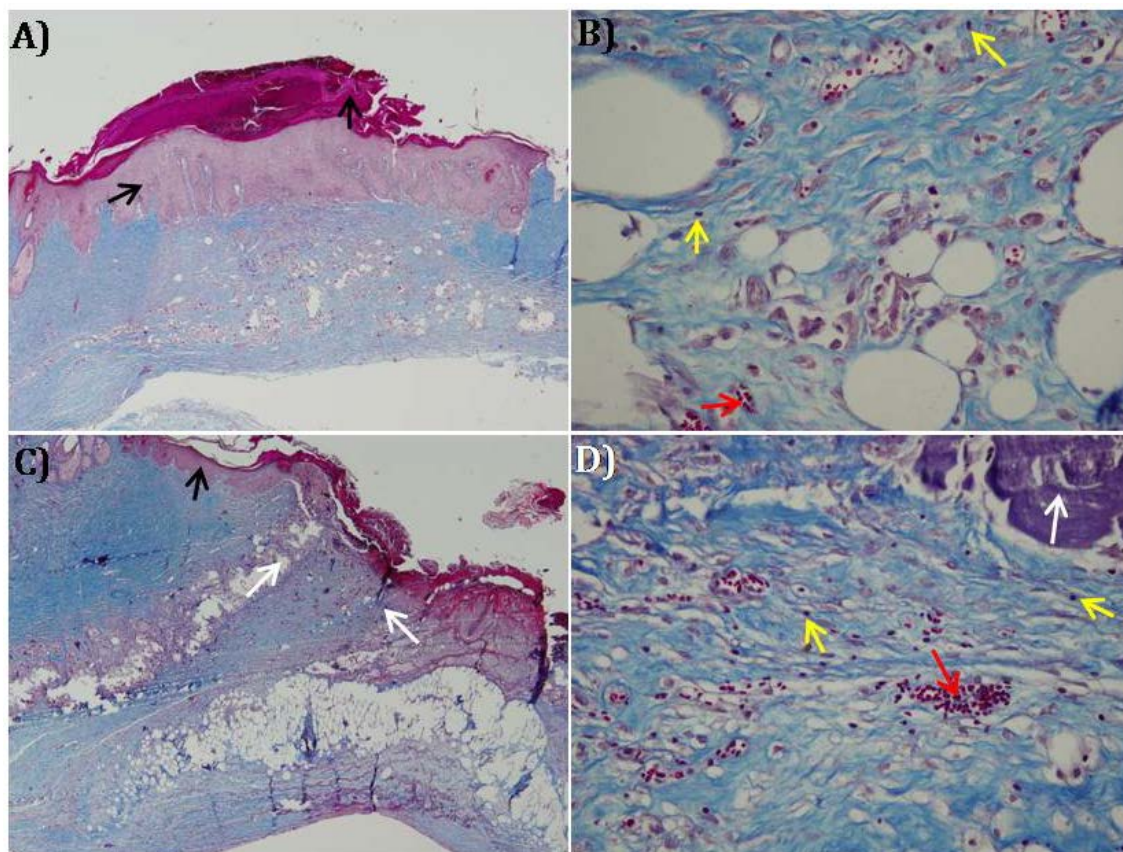
Na slikama 4.92, 4.93 i 4.94 su prikazani histopatološki preseki kože nakon 28 dana od početka tretmana rana u različitim grupama gde se može uočiti izgled i veličina rane, neutrofili, kao i novostvoreni epitel. Histopatološka analiza preseka je pokazala da su rane potpuno reepitelizovale kod jedne od dve preostale životinje iz grupa G1 i G2, dok je u grupi G3 to bio slučaj kod 2 od 3 životinje (tabela 4.10). Ulceracija koja nije potpuno reepitelizovana je u grupi G1 veća u odnosu na odgovarajuće rane u tretiranim grupama, tako da su prečnici rana iznosili 5,9 mm, 2,8 mm i 3,6 mm u grupama G1, G2 i G3, redom (tabela 4.11). Rana jedne netretirane životinje je prožeta neutrofilima što je posledica infekcije rane koja se nije mogla makroskopski detektovati (slika 4.92 C). U svim grupama je u dermu uočena oskudna ili laka infiltracija mononuklearnih zapaljenskih ćelija.



**Slika 4.92.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane kod dve životinje iz kontrolne grupe 1 (G1) sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crne strelice), crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, a žute strelice označavaju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje ukazuje na prisustvo kolagenih vlakana; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x; C, D) delimično reepitelizovana rana gde bela strelica označava ranu, crna strelica pokazuje novostvoreni epitel, narandžasta strelica pokazuje neutrofile u rani, crvene strelice novostvorene krvne sudove, a žute strelice označavaju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje ukazuje na prisustvo kolagenih vlakana; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x



**Slika 4.93.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) kod 2 životinje sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija (crne strelice) gde crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, žute strelice pokazuju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x; C, D) rana (bele strelice) gde crne strelice označavaju delimičnu reepitelizaciju, crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, žute strelice pokazuju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x



**Slika 4.94.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) kod 3 životinje sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crna strelica) gde crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, žute strelice označavaju neutrofile u dermu, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x; C, D) bele strelice označavaju ranu, dok crne strelice pokazuju delimičnu reepitelizaciju, crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, žute strelice označavaju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x

U tabeli 4.10 su sumirani rezultati histopatološke analize uzoraka kože kod kojih je došlo do potpune reepitelizacije rane nakon 28 dana od početka tretmana hronične lezije kod životinja iz svih grupa odnosno kod netretiranih životinja u kontroli 1 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3).

**Tabela 4.10.** Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože potpuno reepitelizovanih rana nakon 28 dana od početka tretmana hronične lezije netretiranih životinja u kontroli 1 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3)

Parametar	Grupa		
	G1	G2	G3
Broj životinja	1	1	2
Maksimalni prečnik ulceracije (mm)	0	0	0
Debljina epitela na rubu ulceracije ( $\mu\text{m}$ )	385,2	282,8	562 $\pm$ 120
Zona granulacionog tkiva (mm)	4,5	4,05	4,4 $\pm$ 2,4
Maksimalna širina zone novostvorenog epitela (mm)	5,3	5,35	3,4 $\pm$ 2,5

U tabeli 4.11 su sumirani rezultati histopatološke analize uzoraka kože kod kojih je došlo do delimične reepitelizacije rane nakon 28 dana od početka tretmana hronične lezije kod životinja iz svih grupa odnosno kod netretiranih životinja u kontroli 1 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3).

**Tabela 4.11.** Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože delimično reepitelizovanih rana nakon 28 dana od početka tretmana hronične lezije netretiranih životinja u kontroli 1 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3)

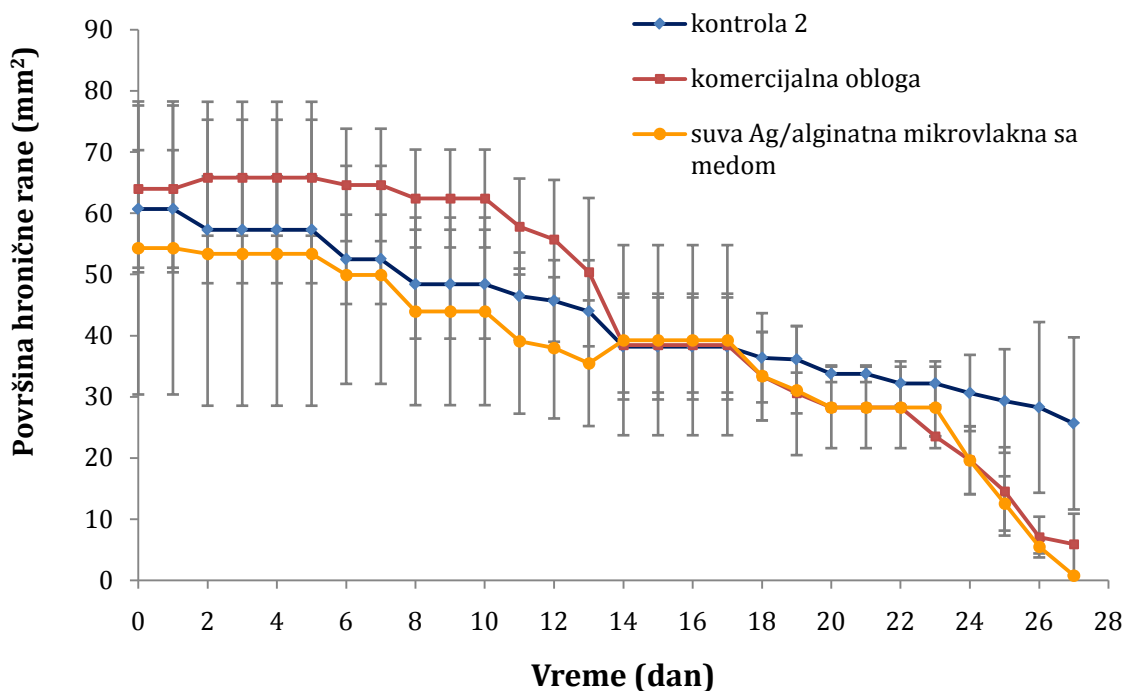
Parametar	Grupa		
	G1	G2	G3
Broj životinja	1	1	1
Maksimalni prečnik ulceracije (mm)	5,9	2,8	3,6
Debljina epitela na rubu ulceracije ( $\mu\text{m}$ )	516,8	214,4	271,6
Zona granulacionog tkiva (mm)	1,45	3,2	2,45
Maksimalna širina zone novostvorenog epitela (mm)	1,5	2,1	1,5

#### 4.4.3.2 ISPITIVANJA Ag/ALGINATNIH MIKROVLAKANA SA MEDOM NA MODELU NEKROZE KOD PACOVA

U drugoj eksperimentalnoj seriji je ispitivana efikasnost Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom na zarastanje hroničnih rana i upoređena sa komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom za rane i netretiranom kontrolnom grupom 2. Mikrovlakna korišćena u ovoj studiji su opisana u poglavlju 4.2.5, i imala su koncentraciju nanočestica srebra  $1,2 \pm 0,08$  mM. Komercijalna obloga za rane je ista ona koja je korišćena u ispitivanjima na modelu opekotina kod miševa (poglavlje 4.4.2) i na bazi je suvih Ca-alginatnih mikrovlakana (prečnika  $20 \pm 4$   $\mu\text{m}$ ) koja su potopljena u kestenov med. Nakon 14 dana od indukovanja kada su rane dostigle svoju maksimalnu površinu počeo je svakodnevni tretman u grupi G2 sa  $206 \pm 25$  mg komercijalne obloge, a u grupi G3 sa  $20 \pm 3$  mg suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom. Tokom ispitivanja, sve životinje su se ponašale normalno, i nije detektovana infekcija u ranama bilo makroskopski bilo mikroskopski.

Na slici 4.95 je prikazana zavisnost površine hroničnih rana od vremena za sve tri ispitivane grupe gde se na osnovu kontrakcije rane procenjuje ozdravljenje rane. Pri tom su u grupama G2 i G3 izostavljeni rezultati za po jednu životinju kod kojih nije došlo do zarastanja. Nakon 14 dana od indukcije, rane su dostigle svoju maksimalnu površinu (dan 0 na slici 4.91). Makimalne površine hroničnih rana su se razlikovale između ispitivanih grupa iako ne statistički značajno. U kontrolnoj grupi 2 (G1) maksimalna površina hronične rane je iznosila  $60,7 \pm 9,6$   $\text{mm}^2$ , u grupi G2 je iznosila  $64 \pm 13,6$   $\text{mm}^2$  i u grupi G3 je iznosila  $54,5 \pm 20,4$   $\text{mm}^2$ . Dobijeni rezultati su pokazali da kod sve tri ispitivane grupe nakon dostizanja maksimalne površine rane dolazi do njihove kontrakcije i postepenog ozdravljenja (slika 4.95). Tako se nakon 11 dana od početka tretmana hronične rane zapaža da grupa tretirana suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) i kontrolna grupa (G1) imaju gotovo isti trend kontrakcije hronične rane. Međutim, kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) kontrakcija rane je nešto sporija u odnosu na grupe G1 i G3 sve do 14-og dana od početka tretman.

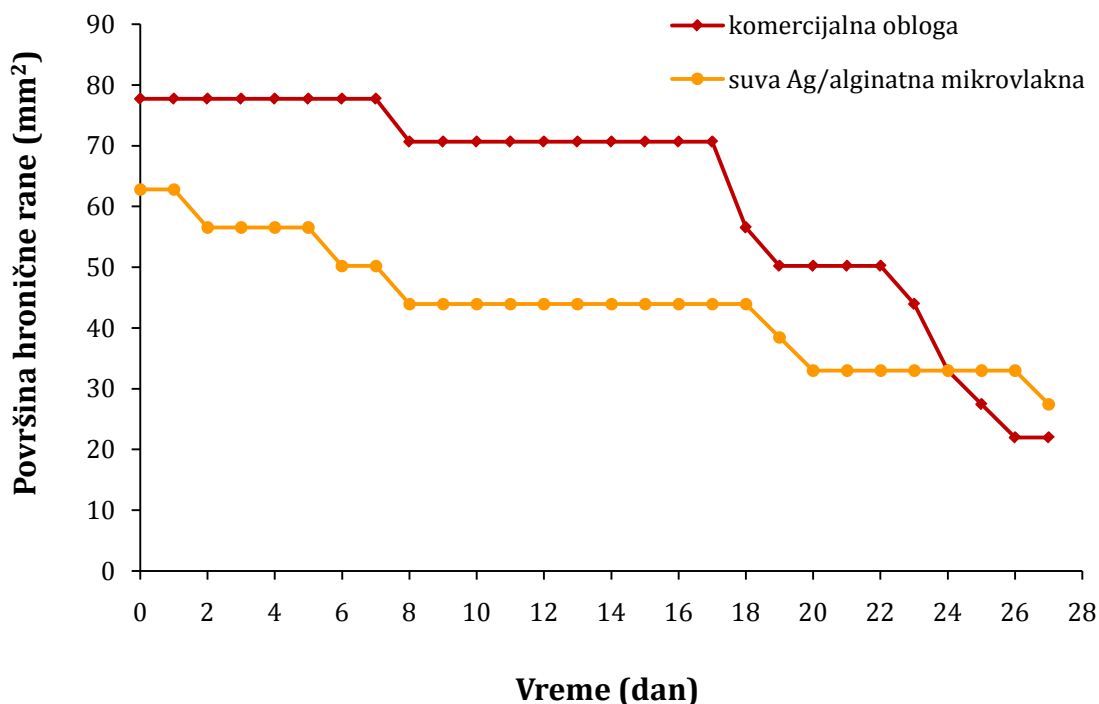
Takođe, može se zapaziti da u jednom periodu (od 14-og do 19-og dana) izostaje kontrakcija rana kod svih ispitivanih grupa, nakon čega se nastavlja kontrakcija sve do kraja ispitivanog perioda. Površina rane je nakon 28 dana tretmana u tretiranim grupama G2 i G3 iznosila 9 % i 1,5 % maksimalne površine rane redom, dok je u kontrolnoj grupi ta vrednost iznosila čak 42 % maksimalne površine rane. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da je na kraju ispitivanog perioda značajno manja površina rane u tretiranim grupama u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu 2, kao i da je manja površina rane u grupi tretiranoj Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) u odnosu na tretman komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2). Međutim, mora se naglasiti da razlike između grupa ipak nisu bile statistički značajne.



**Slika 4.95.** Zavisnost površine hronične rane od vremena za kontrolnu grupu 2 (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupu tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) (eksperimentalno dobijeni podaci su srednja vrednost najmanje 3 merenja)

Takođe, treba naglasiti da kod po jedne životinje iz grupa G2 i G3 nije došlo do zarastanja hronične rane u toku ispitivanog perioda i na slici 4.96 je prikazana

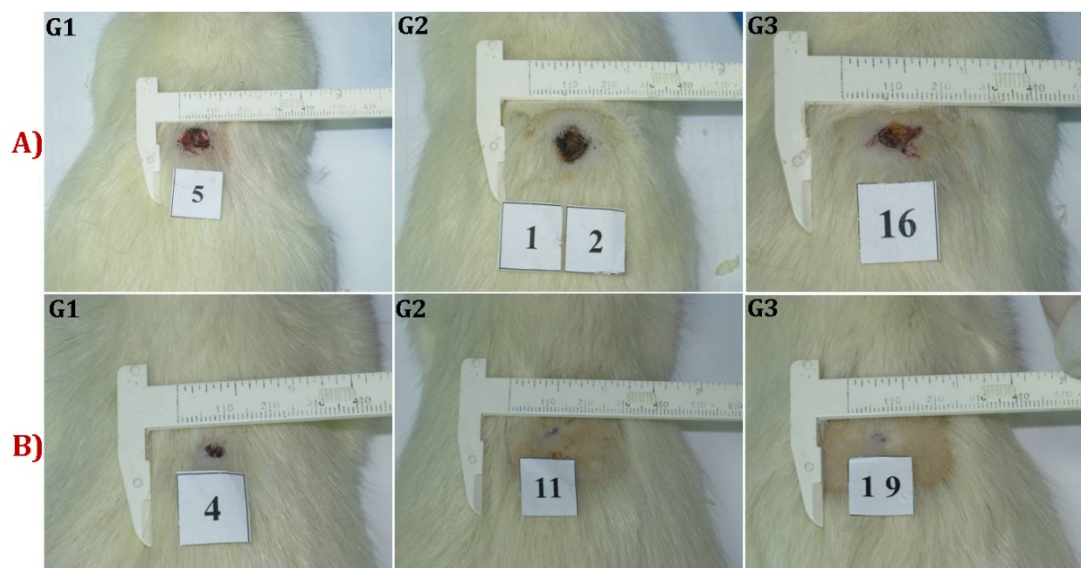
zavisnost površina tih hroničnih rana sa vremenom. Dobijeni rezultati su pokazali da je kod obe životinje nakon dostizanja maksimalne površine hronične rane od 77,7 mm<sup>2</sup> kod životinja iz grupe G2 i 62,8 mm<sup>2</sup> kod životinja iz grupe G3 došlo do postepene kontrakcije rane. Pri tome se kod obe životinje uočava odsustvo kontrakcije od 8-og dana koje je trajalo 9 dana kod životinje iz grupe G2, odnosno 10 dana kod životinje iz grupe G3. Nakon toga ponovo počinje kontrakcija rana kod obe životinje s'tim da je kod životinje iz grupe G3 uočen još jedan period stagniranja u trajnju od 7 dana (od 20-og do 27-og dana tretmana). Na kraju ispitivanog perioda površina rane kod životinje iz grupe G2 je iznosila 22 mm<sup>2</sup>, a iz grupe G3 27,5 mm<sup>2</sup>. Dobijeni rezultati ukazuju da je kod životinje tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom nakon 28 dana tretmana došlo do smanjenja rane za oko 70 % u odnosu na maksimalnu površinu hronične rane, dok je to smanjenje iznosilo oko 60 % za životinju tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom.



**Slika 4.96.** Zavisnost površine hronične rane od vremena za jednu životinju iz grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i jednu životinju iz grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3)

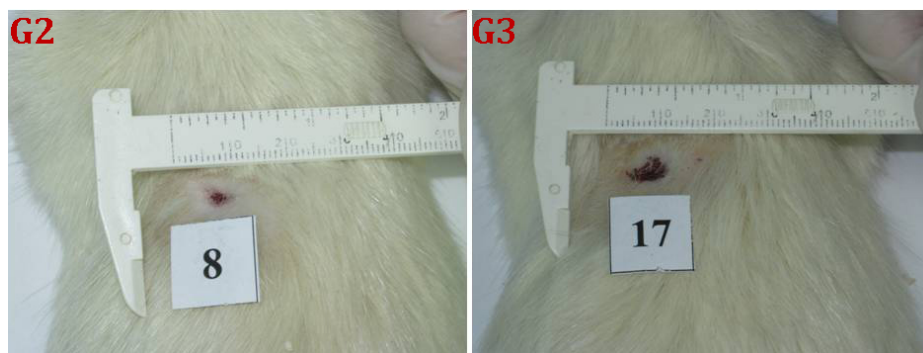


Na slici 4.97 je prikazana klinička evaluacija zarastanja hroničnih rana nakon 14 i 28 dana tretmana rane kod kontrolne grupe 2 (G1), grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) kod životinja kod kojih je došlo do zarastanja rana.



**Slika 4.97.** Klinička evaluacija ozdravljenja hroničnih rana kod mužjaka *Wistar* pacova u kontrolnoj grupi 2 (G1), grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3): A) hronične lezije nakon 14 dana tretmana; B) hronične lezije nakon 28 dana tretmana; primeri rana u grupama G2 i G3 gde je došlo do zarastanja

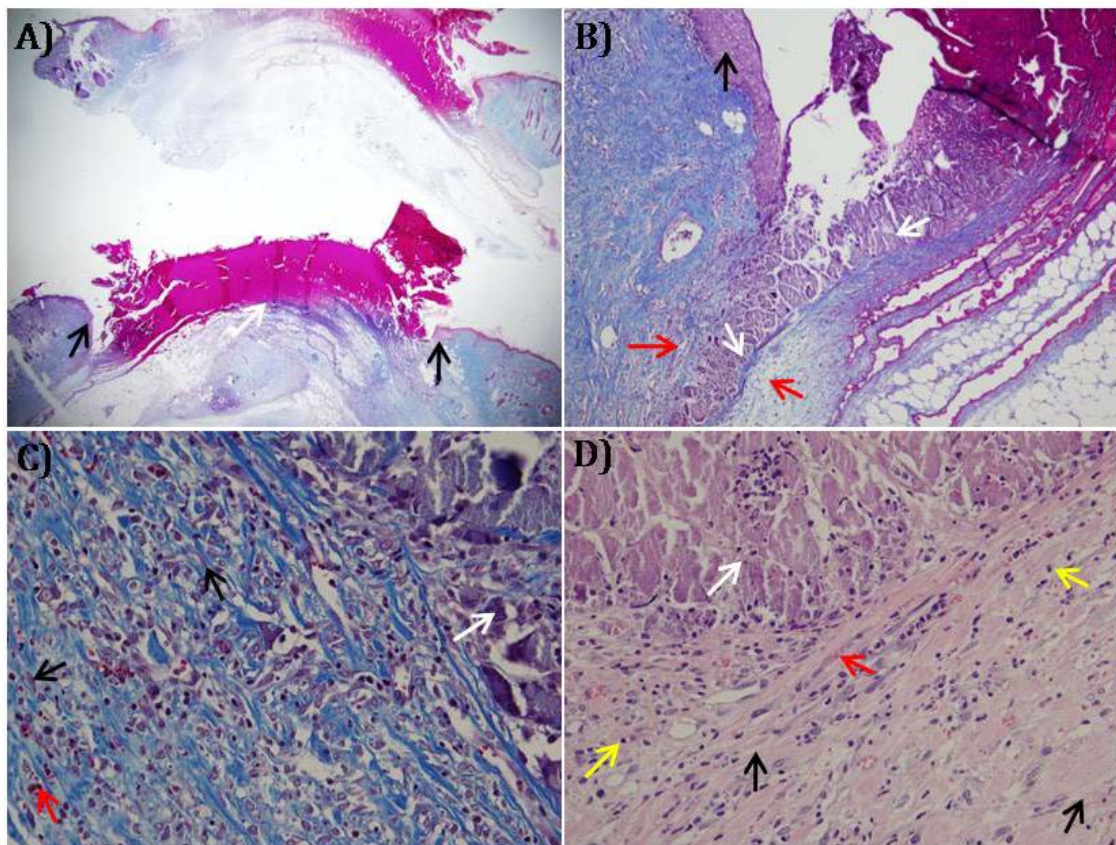
Na slici 4.98 je prikazana klinička evaluacija zarastanja hroničnih rana kod životinja kod kojih nije došlo do ozdravljenja nakon 28 dana tretmana rana komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3).



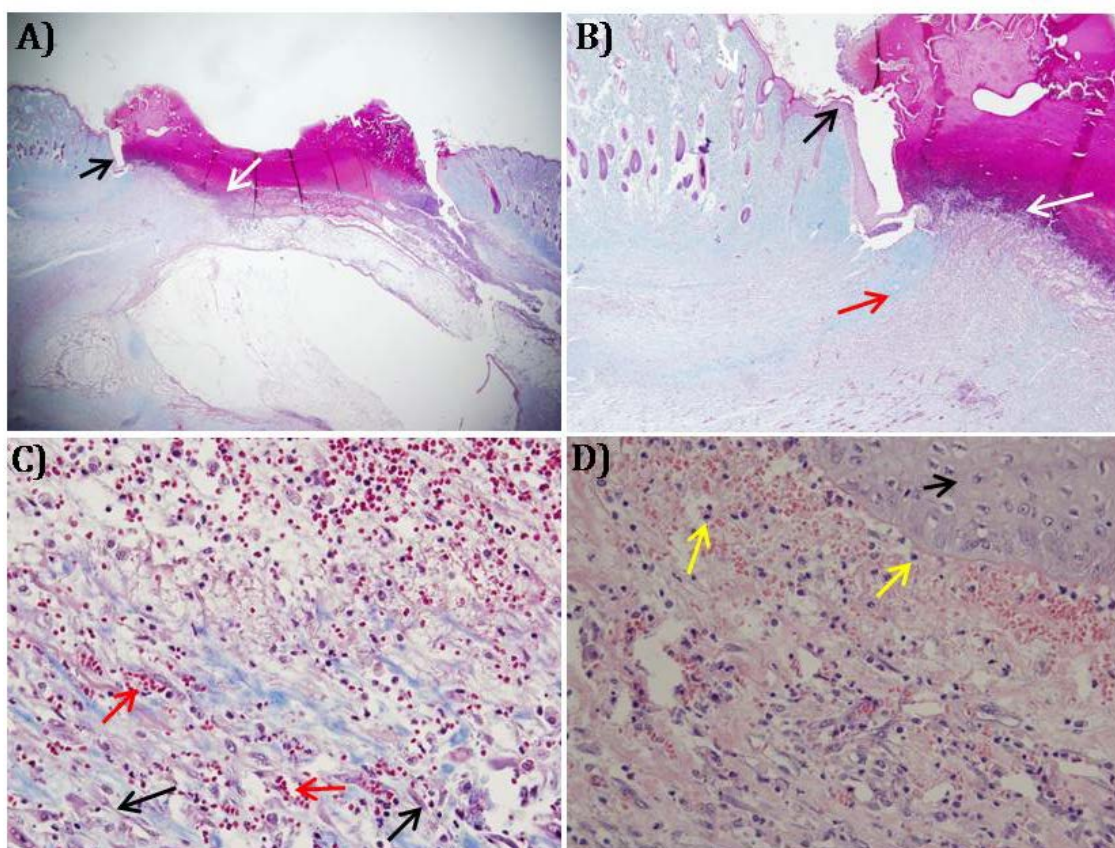
**Slika 4.98.** Klinička evaluacija ozdravljenja hroničnih rana kod mužjaka *Wistar* pacova kod kojih nije došlo do ozdravljenja nakon 28 dana tretmana rana komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3)

Makroskopski dobijeni podaci su potkrepljeni histopatološkom analizom.

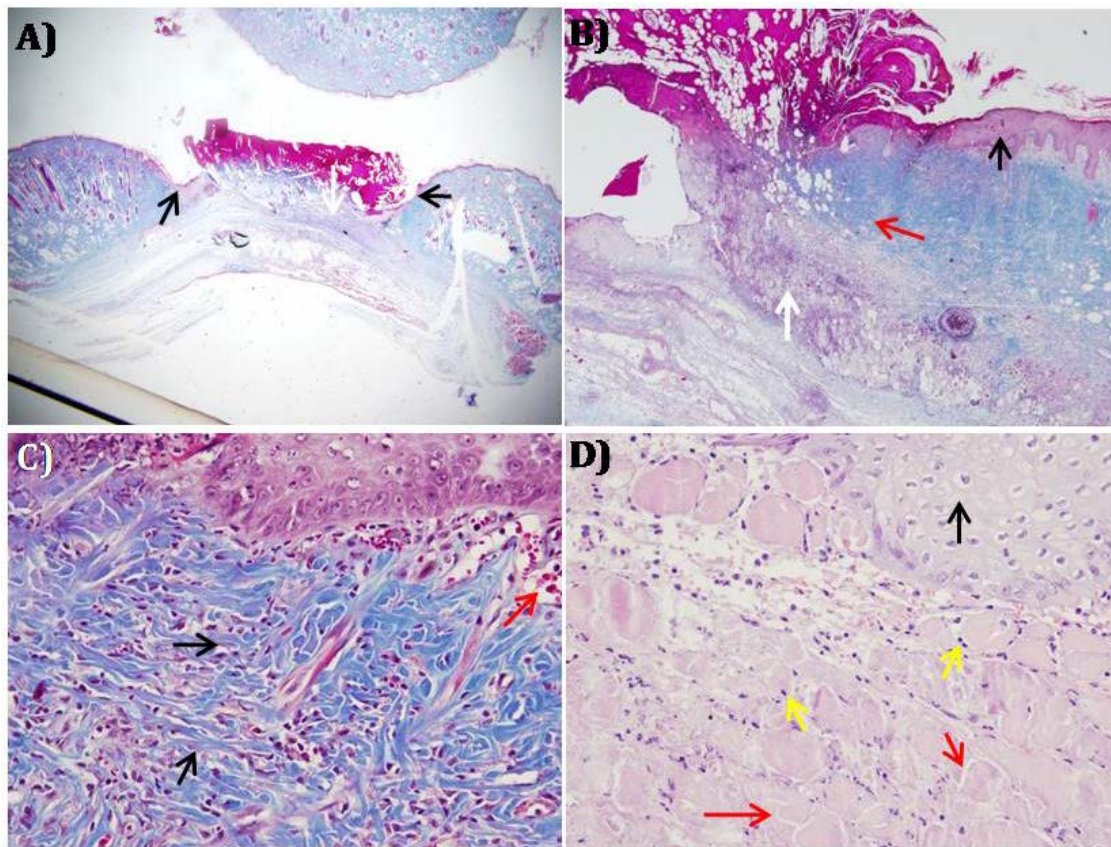
Na slikama 4.99, 4.100 i 4.101 su prikazani histopatološki nalazi preseka kože nakon 14 dana od početka tretmana hroničnih rana u različitim grupama gde se može uočiti izgled i veličina rane, granulaciono tkivo, neutrofili, edem, kao i novostvoreni epitel. Histopatološka analiza preseka je pokazala da nekroza zahvata epiderm i deo derma kod svih ispitivanih grupa. Maksimalni prečnik ulceracije manji je kod grupe G3 u odnosu na grupe G1 i G2 i ova razlika se pokazala statistički značajnom ( $p < 0,05$ ) (tabela 4.12). Zidove rana u svim ispitivanim grupama čini granulaciono tkivo sa lakostepenom inflamacijom i infiltracijom neutrofila kod grupe G1, dok je kod grupe G2 uočena laka do umerena inflamacija, a kod grupe G3 oskudna inflamacija. U predelu dna rane postoji umereni edem kod grupe G1 i izraženi kod grupe G3, dok kod grupe G2 nije uočeno prisustvo edema. Takođe, uočava se zona reepitelizacije u svim ispitivanim grupama.



**Slika 4.99.** Histopatološki nalaz uzoraka kože nakon 14 dana tretmana hronične lezije kontrolne grupe 2 (G1): A) crne strelice označavaju reepitelizaciju, dok bela strelica pokazuje ranu; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) crna strelica označava reepitelizaciju, bele strelice pokazuju ranu, dok crvene strelice pokazuju granulaciono tkivo; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) rana (bela strelica) koju počev od ivica i dna popunjava granulaciono tkivo, sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvena strelica) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) bela strelica označava dno rane, žute strelice neutrofile, crvena strelica novostvoreni krvni sud, dok crne pokazuju edem; H&E bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.100.** Histopatološki nalaz uzoraka kože nakon 14 dana tretmana hronične lezije kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2): A) bela strelica označava ranu, crna strelica pokazuje reepitelizaciju; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) bela strelica označava ranu, crna strelica pokazuje reepitelizaciju, dok crvena strelica pokazuje granulaciono tkivo; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) granulaciono tkivo, sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvene strelice) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) crna strelica označava reepitelizaciju, a žute strelice neutrofile, H&E bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.101.** Histopatološki nalaz uzoraka kože nakon 14 dana tretmana hronične lezije kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3): A) crne strelice označavaju reepitelizaciju, bela strelica označava ranu, Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) crna strelica označava reepitelizaciju, bela strelica označava ranu, dok crvena strelica pokazuje granulaciono tkivo; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) granulaciono tkivo, sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvena strelica) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) crna strelica označava reepitelizaciju, crvene stelice označavaju edem, dok žute strelice pokazuje neutrofile, H&E bojenje, uveličanje 400x

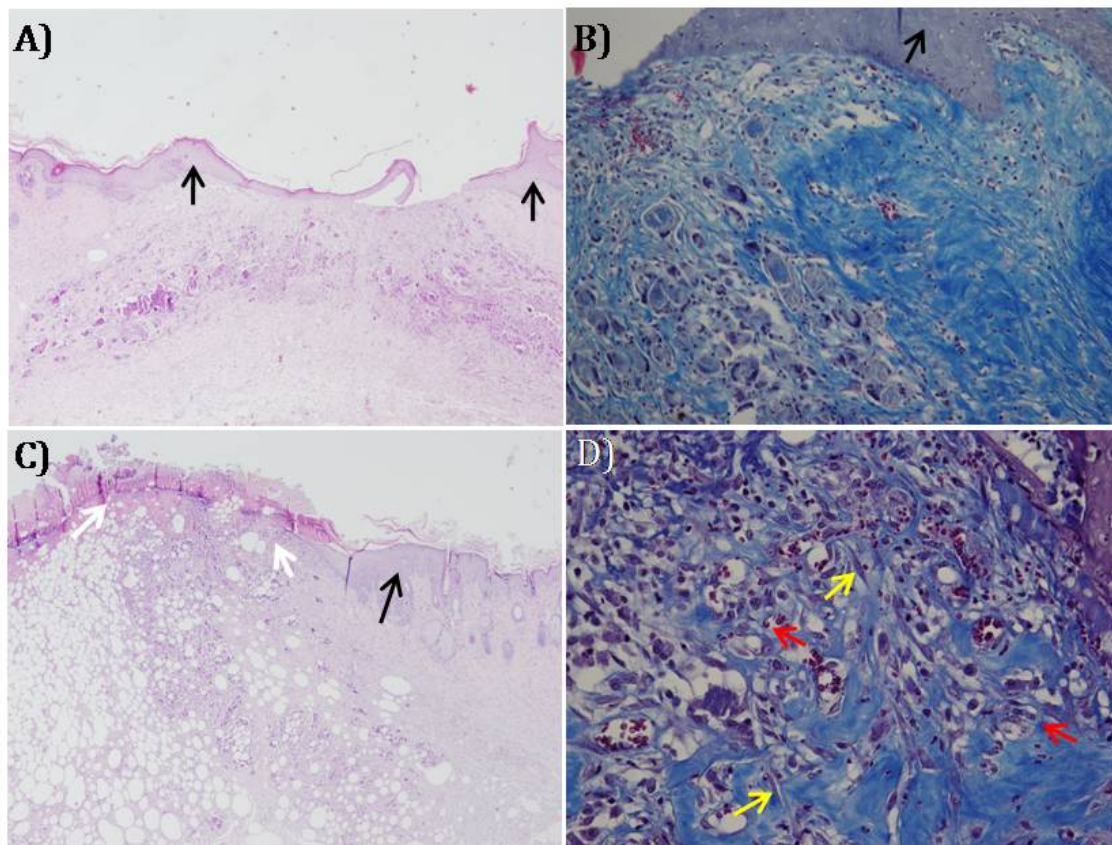
U tabeli 4.12 prikazani su sumirani rezultati histopatološke analize isečaka kože nakon 14 dana tretmana hronične lezije kontrolne grupe 2 (G1), grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3).

**Tabela 4.12.** Sumirani prikaz rezultata histopatološke analize tkiva kože nakon 14 dana od indukcije hronične lezije netretiranih životinja u kontroli 2 (G1), životinja tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3)

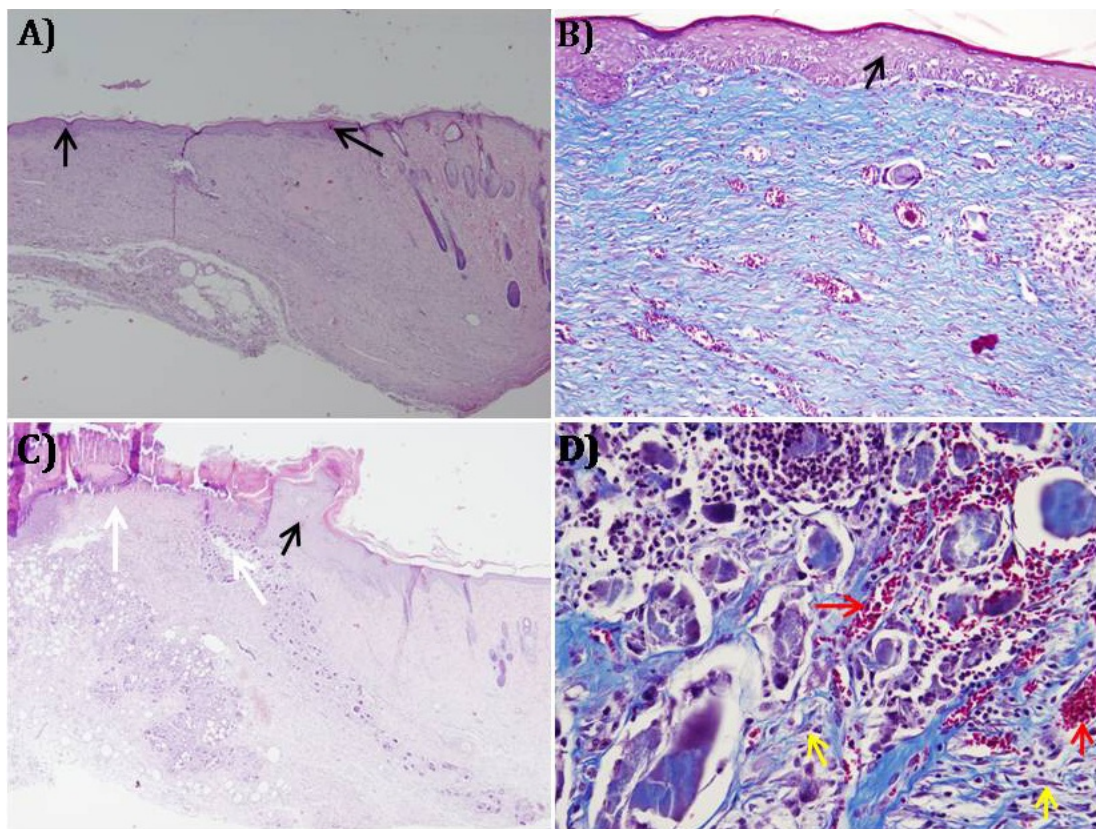
Parametar	Grupa			P
	G1	G2	G3	
Broj životinja	3	3	3	
Maksimalni prečnik ulceracije (mm)	7,7 ± 1	7,5 ± 1,4	4,8 ± 0,7	0,024 <sup>*a,b</sup>
Debljina epitela na rubu ulceracije (µm)	247 ± 62,3	169,4 ± 69,6	186,4 ± 48,2	0,326
Zona granulacionog tkiva (mm)	1,7 ± 1,0	1,77 ± 1,26	1,7 ± 0,8	0,995
Maksimalna širina zone novostvorenog epitela (mm)	2,0 ± 0,7	2 ± 0,7	1,6 ± 0,1	0,639

p vrednosti su izračunate jednofaktorskom ANOVA testom; <sup>\*a</sup> razlika između grupa G1 i G2 (p<0,05); <sup>\*b</sup> razlika između grupa G1 i G3 (p<0,05) naknadni test, Tukey HSD.

Na slikama 4.102, 4.103 i 4.104 su prikazani histopatološki nalazi preseka kože nakon 28 dana od početka tretmana hronične rane kod različitih grupa gde se može uočiti izgled i veličina rane, novostvoreni epitel i granulaciono tkivo. Histopatološka analiza preseka je pokazala da su rane potpuno reepitelizovale kod dve od ukupno tri životinje u svim ispitivanim grupama (tabela 4.13). Pri tome su prečnici rana koje nisu potpuno reepitelizovale iznosili 8,05 mm kod životinje iz grupe G1, 4,74 mm kod životinje iz grupe G2 i 3,91 mm kod životinje iz grupe G3 (tabela 4.14). Na osnovu prečnika nereepitelizovanih rana može se uočiti da je rana kod životinje iz grupe G1 bilo značajno veća u odnosu na rane tretiranih životinja. U grupi G3 novostvoreni epitel je nešto tanji u odnosu na grupe G1 i G2, ali ova razlika nije bilo statistički značajna. U ranama gde nije došlo do potpune reepitelizacije nespecifično granulaciono tkivo potpuno ispunjava ranu kod životinje iz grupe G3, dok je kod životinje iz grupe G2 granulaciono tkivo izraženije nego kod životinje iz grupe G1.

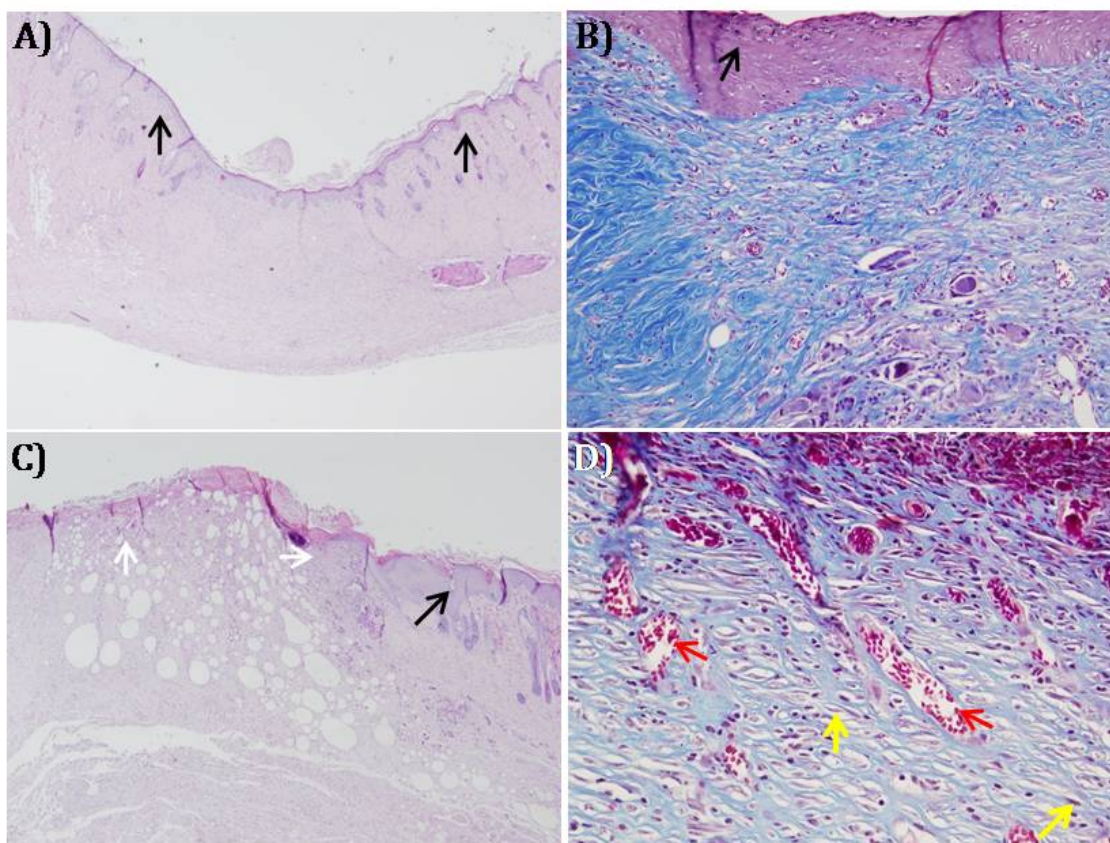


**Slika 4.102.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane kod kontrolne grupe 2 (G1) kod životinja sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crne strelice), pri čemu plavo obojenje (B) ukazuje na prisustvo kolagenih vlakana; H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C, D) delimično reepitelizovana rana, gde bela strelica označava ranu, crna strelica pokazuje novostvoreni epitel sa granulacionim tkivom, koje čine fibroblasti (žute strelice), novostvoreni krvni sudovi (crvene strelice) i kolagena vlakna (plavo obijenje, slika D); H&E bojenje, uveličanje 100x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x



**Slika 4.103.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) kod životinja sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crne strelice), pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C, D) rana (bele strelice) sa delimičnom reepitelizacijom (crna strelica) i granulacionim tkivom, koga čine fibroblasti (žute strelice), novostvoreni krvni sudovi (crvene strelice) i kolagena vlakana (plavo obojenje, na slici D); H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x





**Slika 4.104.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) kod životinja sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crna strelica) pri čemu plavo obojenje (B) predstavlja kolagena vlakna; H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C, D) bele strelice označavaju ranu, crna strelica delimičnu reepitelizaciju, dok granulaciono tkivo čine fibroblasti (žute strelice), novostvoreni krvni sudovi (crvene strelice) i kolagena vlakna (plavo obojenje na slici D); H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x

U tabeli 4.13 prikazani su sumirani rezultati histopatološke analize isečaka kože nakon 28 dana tretmana hronične lezije kod životinja kod kojih je došlo do potpune reepitelizacije rane kod kontrolne grupe 2 (G1), grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3).

**Tabela 4.13.** Sumirani prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože, potpuno reepitelizovanih rana, nakon 28 dana od indukcije hronične lezije netretiranih životinja u kontroli 2 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3)

Parametar	Grupa		
	G1	G2	G3
Broj životinja	2	2	2
Maksimalni prečnik ulceracije (mm)	0	0	0
Debljina epitela na rubu ulceracije ( $\mu\text{m}$ )	$105,2 \pm 20,9$	$99 \pm 33,2$	$105,7 \pm 11$
Zona granulacionog tkiva (mm)	$4 \pm 1,6$	$4,8 \pm 1$	$4,3 \pm 0,7$
Maksimalna širina zone novostvorenog epitela (mm)	$3,87 \pm 1,37$	$6,9 \pm 1,7$	$3,6 \pm 0,5$

U tabeli 4.14 prikazani su sumirani rezultati histopatološke analize isečaka kože nakon 28 dana tretmana hronične lezije kod po jedne životinje iz kontrolne grupe 2 (G1), grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) kod kojih je došlo do delimične reepitelizacije.

**Tabela 4.14.** Sumirani prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože, delimično reepitelizovanih rana, nakon 28 dana od indukcije hronične lezije kod pojedne životinje iz kontrolne grupe 2 (G1), grupe tretirane komercijalnom oblogom (G2) i grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3)

Parametar	Grupa		
	G1	G2	G3
Broj životinja	1	1	1
Maksimalni prečnik ulceracije (mm)	8,05	4,74	3,91
Debljina epitela na rubu ulceracije (μm)	305	193	158
Zona granulacionog tkiva (mm)	2,1	1,4	5,7
Maksimalna širina zone novostvorenog epitela (mm)	2,3	1,5	1,5

## 5. DISKUSIJA

Cilj ove doktorske disertaciji je bio ispitivanje mogućnosti dobijanja hidrogelova u različitim oblicima iz koloidnih rastvora alginata sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra i karakterisanje dobijenih nanokompozitnih hidrogelova prvo u *in vitro* uslovima, a zatim i ispitivanje funkcionalnosti u *in vivo* uslovima za potencijalnu biomedicinsku primenu.

U ovom radu je prvi korak bio optimizacija elektrohemijski sintetisanog Ag/alginatnog koloidnog rastvora. Nanočestice srebra veličine od oko 30 nm (slika 4.1, insert) su uspešno sintetisane u rastvoru alginata elektrohemijskom metodom što je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom, kao i TEM analizom. Da bi dobijeni koloidni rastvor bio primenljiv prvo su ispitivani proces stabilizacije i period stabilnosti. UV-vidljiva spektroskopija je pokazala da koncentracija nanočestica srebra kontinualno raste do određenog nivoa u alginatnom rastvoru po završetku elektrohemijske sinteze (slika 4.2). Modelovanje intenziteta apsorbnace u toku vremena je ukazalo da je rast nanočestica vođen sjedinjavanjem primarnih nanokristala. Dobijena vrednost Avramijevog eksponenta od  $n < 1$  pokazuje da je rast kontrolisan procesima na granici faza (Sung, 2001, Chraska i sar., 2009). U isto vreme, dolazi do rastvaranja malih nanočestica i istovremenog rasta velikih nanočestica, što predstavlja mnogo sporiji Ostvaldov proces sazrevanja, koji postaje dominantan posle završetka perioda aktivnog rasta tj. posle ~3 dana od sinteze. Ovaj mehanizam rasta i stabilizacije nanočestica je u saglasnosti sa modelom rasta nanočestica srebra koji je predložio Ričards (Richards i sar., 2010), kao i sa opisanim procesom aglomeracije nanočestica srebra u toku 24 h od sinteze u rastvoru triblok kopolimera *Pluronic L64* (Angelescu i sar., 2010). Treba naglasiti da je kinetički model primenjen u ovom radu imao za cilj da kvalitativno objasni mehanizam rasta nanočestica srebra i stabilizaciju Ag/alginatnog koloidnog rastvora posle elektrohemijske sinteze dok je za precizno kvantitativno objašnjenje potrebna sveobuhvatnija eksperimentalna analiza veličine i morfologije nanočestica srebra u toku vremena. UV-vidljivom spektroskopijom je zatim pokazano da su Ag/alginatni koloidni rastvori stabilni mesec dana posle

stabilizacije (slika 4.3). Nakon ovog perioda dolazi do uočljive aglomeracije nanočestica što dovodi do snižavanja intenziteta maksimalne apsorbanse i do širenja apsorpcionog spektra (slika 4.4). Međutim, u literaturi je pokazano da su nanočestice srebra prečnika 5-30 nm, dobijene  $\gamma$  zračenjem smeše srebro nitrata (10 mM) i alginata (0,3 mas.%) u prisustvu izopropanola bile stabilne i posle 6 meseci od sinteze na sobnoj temperature (*Liu i sar., 2009*). Ovi podaci ukazuju da su nanočestica srebra sintetisane  $\gamma$  zračenjem bile značajno stabilnije od nanočestica dobijenih elektrohemijском metodom što može biti objašnjeno različitim sastavom alginata koji su korišćeni za stabilizaciju nanočestica. Korišćenjem alginata adekvatnog sastava (npr. molekulske mase, viskoziteta, odnosa G i M jedinica) očekuje se duži period stabilnost Ag/alginatnog koloidnog rastvora.

U ovom radu je zatim pokazano da se jednostavnim razblaživanjem elektrohemijски sintetisanog Ag/alginatnog koloidnog rastvora rastvorom Na-alginata dobijaju stabilni koloidni rastvori sa očuvanim nanočesticama srebra u koncentraciji koja je proporcionalna razblaženju. To je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom pri čemu se maksimalni intenzitet i posle razblaživanja zadržava na talasnoj dužini od  $\sim 405$  nm (slika 4.6). Radi primenljivosti Ag/alginatnog koloidnog rastvora u biomedicinske svrhe ispitana je i mogućnost jednostavne sterilizacije rastvora kuvanjem 30 min nakon čega je prisustvo nanočestica potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.8). Apsorpcioni spektri se pre i posle kuvanja nisu značajno razlikovali, a čak je vrednost maksimalnog intenziteta apsorbanse blago porasla za oko 10 % što ukazuje na dodatnu redukciju jona srebra i/ili stabilizaciju nanočestica (slika 4.8). Ovi rezultati su konzistentni sa metodom sinteze nanočestica redukcijom jona srebra u alginatnom rastvoru grejanjem na 90 °C u toku 1 h gde alginat ne služi samo za stabilizaciju nanočestica srebra već i za redukciju jona srebra (*Sharma i sar., 2012*). Dobijeni rezultati su ukazali na potencijalnu primenljivost alginatnog koloidnog rastvora sa elektrohemijски sintetisanim nanočesticama usled stabilnosti nanočestica srebra, mogućnosti sterilizacije, kao i mogućnost dobijanja rastvora različitih koncentracija nanočestica srebra jednostavnim razblaživanjem. Pored toga,

pokazano je da se dobijeni Ag/alginatni koloidni rastvori mogu uspešno mešati sa rastvorom PVA uz očuvanje nanočestica srebra. Na taj način omogućeno je dobijanje nanokompozita na bazi više polimera koji mogu imati dodatne povoljne efekte kao što su poboljšane mehaničke karakteristike. Dobijeni rezultati su očekivani jer se PVA polimer pokazao kao dobar stabilizator nanočestica srebra (*Wang i sar., 2006, Clemenson i sar., 2008*), a smeše Na-alginata i PVA su uspešno korišćene za dobijanje hidrogelova (*Nam i sar., 2004, Kim i sar., 2008*).

Međutim, problem biomedicinske primene Ag/alginatnih koloidnih rastvora je visoka pH vrednost (~11) što ograničava njihovu primenu u tretmanu rana. Da bi koloidni rastvori sa nanočesticama srebra mogli da se koriste kao medicinska sredstva za lečenje rana zbog svoje antimikrobne aktivnosti (*Panáček i sar., 2009, Xiang i sar., 2011, Radzig i sar., 2013*) potrebno je da pH vrednost ovih preparata bude blago kisela. Zapravo, pH vrednost rana se kreće u opsegu od 7,15 do 8,9 (*Gethin, 2007*), dok je pH vrednost normalne kože između 4 i 6 u zavisnosti od anatomske lokacije i godina (*Schneider i sar., 2007*). Tako da je sledeći korak u ovom radu bio razvoj Ag/alginatnih koloidnih rastvora stabilnih u blago kiseljoj sredini radi potencijalne primene u tretmanu rana. Ispitana je mogućnost snižavanja pH vrednosti koloidnih rastvora primenom askorbinske kiseline i meda, jer se ove komponente već koriste, kako u kozmetičkim, tako i u farmaceutskim preparatima za tretman kože. Pored toga, obe komponente se koriste i za sintezu nanočestica srebra i to askorbinska kiselina kao redukujući agens (*Qin i sar., 2010*), dok se med koristi istovremeno i kao stabilizator i redukujući agens (*Philip, 2010*). Takođe, obe komponente imaju nisku pH vrednost. Rastvor askorbinske kiseline koncentracije 0,1 mg/ml ima pH vrednost oko 2,6, dok se pH vrednost meda kreće od 3,2 do 5,5 u zavisnosti od vrste meda (*Molan, 1992, Aureli i sar., 2002*). U ovom radu je korišćen bagremov med sa pH vrednošću od oko 3,9. Snižavanje pH vrednosti koloidnog rastvora primenom askorbinske kiseline u koncentraciji od 0,1 mg/ml je pokazalo da se u toku 3 nedejne pH vrednost nije statistički značajno menjala (slika 4.12), ali se stabilnost nanočestica značajno narušava tako da je na kraju ispitivanog perioda vrednost maksimalne apsorbance opala za oko 75 %. Ovaj rezultat je negde i očekivan jer je askorbinska kiselina nestabilna u alkalnoj

sredini i dolazi do njene degradacije (Golubitskii i sar., 2007), što utiče i na stabilnost nanočestice srebra. Sa druge strane rezultati dobijeni snižavanjem pH vrednosti Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa različitim koncentracijama meda (5-50 mas.%) su pokazali da dodavanje meda dovodi do snižavanja pH vrednosti smeše uz očuvanje nanočestica srebra. Pri tome je pH vrednost koloidnog rastvora sa 40 mas.% meda iznosila  $5,41 \pm 0,15$  što je poželjno za tretman rana dok su pH vrednosti sa koncentracijom meda od 5-30 mas.% bile iznad željene vrednosti ( $\geq 6$ ). Takođe, pH vrednost koloida sa 50 mas.% meda je bila nešto ispod poželjne vrednosti odnosno  $\sim 4,8$ . Optimalna pH vrednost preparata za tretman kože je oko 5,5, pa stoga Ag/alginatni koloidni rastvor sa 40 mas.% meda ima najpoželjniju pH vrednost. Takođe, praćenje pH vrednosti ovog rastvora u toku 3 nedelje je ukazalo da se pH vrednost održava konstantnom bez statistički značajnog smanjenja. Takođe, zapaženo je da je nakon dodavanja meda u svim koncentracijama došlo do povećanja maksimalnog intenziteta apsorbanse što se može objasniti dodatnom redukcijom jona srebra i/ili stabilizacijom nanočestica. Takođe, u toku 3 nedelje svi koloidni rastvori sa medom su ostali stabilni. Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu primenu Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa medom, poželjno 40 mas.%, u tretmanu rana usled stabilnosti nanočestica srebra, kao i adekvatne pH vrednosti. Takođe, očekuje se da će Ag/alginatni koloidni rastvor sa medom imati bolje karakteristike u odnosu na sam Ag/alginatni koloidni rastvor kao preparat za tretman rana zbog dodatnog stimulišućeg efekta meda (Molan, 2002) na zarastanje rana kao i antimikrobne aktivnosti nanočestica srebra (Panáček i sar., 2009, Xiang i sar., 2011, Radzig i sar., 2013) i meda (Basualdo i sar., 2007).

Opisani rezultati su pokazali raznovrsne mogućnosti manipulacije alginatnih koloidnih rastvora sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra od razblaživanja, snižavanja pH vrednosti dodatkom meda do mešanja sa drugim polimerima. Međutim, potencijalnu primenljivost za tretman rana je potrebno prvo pokazati u pretkliničkim ispitivanjima na životinjama. U ovom radu je ispitana funkcionalnost alginatnog koloidnog rastvora sa koncentracijom nanočestica srebra od 1 mM (0,011 mas.%) i dodatkom askorbinske kiseline (0,1 mg/ml) na termičkim opekotinama II stepena (78,5 mm<sup>2</sup>) kod *Wistar* pacova i

brzina zarastanja je upoređena sa netretiranom kontrolnom grupom i grupom tretiranom komercijalnom kremom na bazi srebra sulfadiazine (1 mas.%). U *in vivo* ispitivanjima, kod životinja koje su bile tretirane Ag/alginatnim rastvorom kao i komercijalnom kremom došlo je do značajno bržeg zarastanja rana nakon 21-og dana u odnosu na kontrolu gde su rane zarasle nakon 25 dana. Histopatološka analiza je pokazala povećanje granulacije i reepitelizacije, smanjenje inflamacije i bolju organizaciju ekstracelularnog matriksa u obe tretirane grupe. Sličan trend je objavljen pri ispitivanju obloga za rane u obliku rastvorljivih filmova koji su sadržali alginat i škrob, impregnirani nanočesticama srebra u koncentraciji od 0,02 mM (*Marie Arockianathan i sar., 2012*). Ta studija je pokazala da su otvorene rane na leđima pacova (400 mm<sup>2</sup>), nastale isecanjem hirurškim putem, u grupi tretiranoj ispitivanim filmovima potpuno zarasle nakon 18 dana, u poređenju sa 25 dana koji su bili neophodni za spontano zarastanje ovih rana u kontrolnoj grupi. U ovom radu su rane nešto brže zarasle nego u eksperimentalnim ispitivanjima u ovoj doktorskoj disertaciji što se može objasniti manjom dubinom hirurških rana, u odnosu na opekotine II stepena. Međutim, treba napomenuti da se postupak dobijanja opisanih filmova sa nanočesticama sastojao iz hemijske redukcije jona srebra za koju je pored izvora jona srebra i alginate potreban natrijum borhidrid rastvoren u 0,3 M natrijum hidroksidu za razliku od elektrohemijske sinteze nanočestica srebra koja zahteva samo izvor jona srebra i alginat. Na osnovu makroskopskih rezultata i histopatološke analize može se zaključiti da je Ag/alginatni koloidni rastvor pokazao statistički ekvivalentne rezultate kao komercijalna krema na bazi srebra sulfodiazina iako je količina srebra naneta na ranu bila oko 100 puta manja (0,013 mg u odnosu na 1,55 ± 0,21 mg u kremi). Treba takođe istaći da je komercijalna krema optimizovana, i da sadrži sastojke koji stimulišu ozdravljenje kože kao što su lako parafinsko ulje, sorbitol itd. Sa druge strane, alginatni koloidni rastvor sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama sem alginate, nanočestica srebra i dodate askorbinske kiseline nije sadržao dodatne komponente koje bi stimulisale ozdravljenje povrede. Time je značaj dobijenih rezultata veći, a dodavanjem odgovarajućih komponenti, kao što je med, moglo bi se očekivati dodatno poboljšanje funkcionalnosti, kao i stabilnosti Ag/alginatnog koloidnog rastvora.



U medicinskom tretmanu rana, pogotovo dubokih, nekrotičnih i sa obilnim eksudatom potrebno je koristiti obloge za rane koje visokim sorpcionim kapacitetom regulišu nivo vlage u rani. Zbog toga se hidrogelovi veoma često koriste kao obloge za rane među kojima je Ca-alginat jedan od najzastupljenijih (Paul i Sharma, 2004, Queen i sar, 2004). Iz tog razloga drugi deo istraživanja u ovoj doktorskoj tezi je bio posvećen dobijanju i karakterisanju nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata sa inkorporisanim nanočesticama srebra. Pri tom je ispitivana mogućnost dobijanja nanokompozitnih hidrogelova različitih geometrijskih oblika kao što su mikročestice, mikrovlakna i diskovi.

Mikročestice prečnika manjeg od 1 mm su posebno atraktivan oblik za imobilizaciju i kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci kao što su lekovi, faktori rasta, hormoni i enzimi, zbog svoje velike specifične površine i malog rastojanja za difuzioni prenos mase (El-Sherbiny i Smyth, 2010). Takođe, alginatne mikročestice su se pokazale pogodne za imobilizaciju ćelija različitog porekla kao što su ćelije mikroorganizama (bakterije, kvasci, plesni, alge), insekata, biljaka i životinja, ali i za imobilizaciju humanih ćelija (Smidsrod i sar., 1990, Nedović, 1999).

U ovoj tezi Ca-alginatne mikročestice sa inkorporisanim nanočesticama srebra su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom Ag/alginatnog koloidnog rastvora. Prisustvo nanočestica srebra je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom nakon rastvaranja mikročestica pri čemu je maksimalna apsorbance ostala na oko 405 nm, kao i kod koloidnih rastvora, ukazujući na nepromenjenu veličinu nanočestica. Međutim intenzitet apsorbance je bio veći, što je ukazalo na veću koncentraciju nanočestica srebra u mikročesticama nego u polaznom Ag/alginatnom koloidnom rastvoru. Ovaj rezultat je potvrđen i merenjem koncentracije srebra u mikročesticama pomoću AAS pri čemu su dobijene značajno veće koncentracije srebra u mikročesticama nego u inicijalnom koloidnom rastvoru (slika 4.21). Koncentracija srebra u mikročesticama je bila za oko 20 % veća nego u odgovarajućim početnim koloidnim rastvorima, sem u slučaju 0,5 mM koloidnog rastvora gde je koncentracija u mikročesticama bila nešto niža ( $0,28 \pm 0,11$  mM). Pokazano je da sama elektrostatička ekstruzije nema uticaja na

koncentraciju nanočestica u istisnutom koloidnom rastvoru, kao ni prisustvo Na-citrata prilikom rastvaranja mikročestica. Na osnovu literaturnih podataka (*Velings i Mestdagh, 1995*) dobijeni rezultati se mogu objasniti kontrakcijom alginatnog gela tokom geliranja. Takođe, ne treba zaboraviti i na eksperimentalne greške prilikom uzorkovanja mikročestica zbog veoma brze evaporacije vode sa površine mikročestica. Međutim, iz navedenih rezultata može se zaključiti da svi joni srebra u koloidnom rastvoru bivaju redukovani tokom elektrohemijske sinteze nanočestica srebra, koje ostaju očuvane tokom elektrostatičke ekstruzije.

Ispitivanje uticaja paramenara elektrostatičke ekstruzije na veličinu Ag/alginatnih mikročestica je pokazalo najveći uticaj elektrostatičkog napona slično kao pri dobijanju čistih Ca-alginatnih mikročestica (*Manojlović, 2005*). Zavisnost prečnika mikročestica od napona je modelovana primenom jednačine (1.8) predložene za dobijanje Ca-alginatnih mikročestica (*Bugarski i sar., 2006*). Predviđanja modela su u kvalitativnoj saglasnosti sa eksperimentalno dobijenim podacima (slika 4.22), pri čemu model predviđa veće smanjenje prečnika mikročestica u regionu kritičnog elektrostatičkog napona (4–5 kV). Rezultati modela mogu biti objašnjeni hipotezom da tokom procesa ekstruzije dolazi do promene površinskog napona koloidnog rastvora, kao što je ranije opisano u literaturi (*Bugarski i sar., 2006*). U regionu primene napona nižeg od kritične vrednosti ( $U < U_c$ ), površinski napon tečnosti opada usled odbijanja naelektrisanih molekula na površini kapi što dovodi do smanjenja prečnika kapi. Međutim, u regionu viših vrednosti primenjenog napona ( $U > U_c$ ), povećanje brzine tečnosti može da dovede do povećanja površinskog napona, a samim tim i do povećanja veličine kapljica u odnosu na predviđanja modela koja su zasnovana na pretpostavci konstantne vrednosti površinskog napona. Ovo objašnjenje je konzistentno sa eksperimentalno dobijenim trendom (slika 4.22). Generalno se može zaključiti da prisustvo nanočestica srebra ne utiče na mehanizam formiranja kapi pri primeni elektrostatičke ekstruzije.

Do sada su Ca-alginatne mikročestice korišćene za stabilizaciju nanočestica srebra dobijenih fotohemijском redukcijom, na površini mikročestica (*Saha i sar.,*

2009 i 2010). Ca-alginatne mikročestice dobijene ekstruzionom tehnikom nakon bubrenja u rastvoru srebro nitrata su izložene UV zračenju. Tako da su se nanočestice srebra formirale samo na površini mikročestica. Inkorporacija nanočestica unutar mikročestica u poređenju sa nanočesticama imobilisanih samo na površini mikročestica omogućava veću koncentraciju nanočestica što dovodi do produženog otpuštanja i aktivnosti. Takođe je u literature pokazano da se elektrostatičkom ekstruzijom mogu dobiti mikročestice na bazi Ca-alginata i hitozana sa inkorporisanim nanočesticama srebra radi antimikrobne primene (Travan i sar., 2009). Pri tome su nanočestice srebra sintetisane hemijskom redukcijom pomoću askorbinske kiseline u rastvoru modifikovanog hitozana (Chitlack, 1-dezoksilaktit-1-il hitozan). Ovaj rastvor je zatim mešan sa rastvorom natrijum-alginata u koji je dodat inaktiviran kalcijum-karbonat i D-glukono- $\delta$ -lakoton, i ukapavan u rastvor kalcijum-hlorida primenom elektrostatičke ekstruzije čime su dobijene hitozan-alginatne mikročestice sa inkorporisanim nanočesticama srebra. Međutim, proces dobijanja ovih mikročestica je komplikovaniji i uključuje veći broj komponenti nego procedura za dobijanje Ag/alginatnih mikročestica pripremljena u ovom radu.

Procedura elektrostatičke ekstruzije u ovom radu je takođe uspešno primenjena za geliranje smeše Ag/alginatni koloidni rastvor i med. Pri tome su dobijene elipsoidne alginatne mikročestice sa inkorporisanim nanočesticama srebra i medom (veće ose  $1000 \pm 180 \mu\text{m}$  i manje ose  $680 \pm 90 \mu\text{m}$ , slika 4.29). Može se pretpostaviti da bi se optimizacijom uslova elektrostatičke ekstruzije mogle dobiti uniformne, sferne mikročestice. I u ovom slučaju intenzitet maksimalne apsorbanse rastvorenih čestica je bio na oko 405 nm, kao i kod koloidnog rastvora sa medom, uz značajno veći intenzitet za oko 25 %, što ukazuje na veću koncentraciju nanočestica srebra. Takođe, i u ovom slučaju dobijeni rezultati se mogu objasniti kontrakcijom alginatnog gela tokom geliranja.

Ista metoda je primenjena i na smeše PVA i Ag/alginatnog koloidnog rastvora. Pri čemu su elektrostatičkom ekstruzijom dobijene čestice prečnika oko  $950 \mu\text{m}$  uz dodatno geliranje metodom zamrzavanja i odmrzavanja (slika 4.31).

Međutim, optimizacijom parametara ekstruzije (napon 8 kV, rastojanje 8 cm) mogu se dobiti mikročestice (prečnik < 1 μm, slika 4.32). Takođe, pokazano je da se nanočestice srebra zadržavaju u PVA/Ag/alginatnim mikročesticama (slika 4.33), pri čemu i nakon 24 h u Na-citratu jedan deo nanočestica ostaje zarobljen u hidrogelu. Dobijeni rezultati su očekivani jer rastvor Na-citrata rastvara alginatni hidrogel (*Smidrod i Skjak-Bræk, 1990, Forster i sar, 2010*), a ne i PVA hidrogel, tako da nanočestice srebra ostaju zarobljene unutar PVA hidrogela.

Radi potencijalne primenljivosti Ag/alginatnih hidrogelova ispitana je mogućnost sušenja i rehidracije Ag/alginatnih mikročestica što je atraktivno za primenu kao antimikrobni puder. U vlažnim i suvim Ag/alginatnim mikročesticama je potvrđeno prisustvo pojedinačnih nanočestica srebra veličine 10-30 nm FE-SEM analizom, ali je zapaženo i prisustvo agregata nanočestica (slika 4.24). Intenzitet maksimalne apsorbanse UV-vidljivih spektara suvih mikročestica je bio za oko 20 % manji od intenziteta vlažnih mikročestica, što se može objasniti formiranjem agregata nanočestica srebra tokom kontrakcije hidrogela prilikom sušenja mikročestica (slika 4.25). Mogućnost rehidracije alginatnog gela i oslobađanje nanočestica srebra iz suvih Ag/alginatnih mikročestica su ispitivani u fiziološkom rastvoru na sobnoj temperaturi kako bi imitirali uslove u rani sa sekrecijom (slika 4.26). Eksperimentalno dobijeni rezultati ukazuju da posle samo 24 h rehidracije u fiziološkom rastvoru i vlažne i suve mikročestice izgube čak 90-95 % nanočestica srebra u odnosu na inicijalne vlažne mikročestice, dok nakon 5 dana dolazi do pucanja mikročestica i do potpunog gubitka nanočestica. Ovi rezultati su i očekivani jer dolazi do difuzije nanočestica i/ili jona srebra iz mikročestica, kao i jona hlora iz rastvora i do formiranja nerastvorne soli AgCl. U prisustvu Na<sup>+</sup> u fiziološkom rastvoru, Ca<sup>2+</sup> unutar gela se zamenjuju sa Na<sup>+</sup>, što dovodi do relaksacije lanaca i poboljšava se bubrenje gela, kao i oslobađanje supstance imobilisane unutar alginatnog matriksa (*Bajpai i sar., 2008, Vreeker i sar., 2008*). Sa druge strane, dobijen je nizak stepen rehidracije suvih mikročestica u destilovanoj vodi što je i očekivano s obzirom da tokom sušenja dolazi do dodatnog umrežavanja alginatnih lanaca, koji su stabilni u destilovanoj vodi jer nema jona natrijuma koji bi relaksirali lance zamenom sa kalcijumovim

jonima unutar gela (Vreeker i sar., 2008). Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalnu primenu suvih Ag/alginatnih mikročestica, koje uspešno zadržavaju nanočestice srebra dok demonstriraju slično ponašanje, odnosno bubrenje u fiziološkom rastvoru kao vlažne mikročestice.

Odabrani nanokompozitni hidrogelovi na bazi alginata i nanočestica srebra su zatim ispitani u nizu *in vitro* studija i to u pogledu biomehaničkih karakteristika, citotoksičnosti, antimikrobne aktivnosti i otpuštanje srebra.

Biomehaničke karakteristike su ispitivane u biomimičnom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom koji imitira *in vivo* uslove u artikularnoj hrskavici. Primenjena je deformacija od 10 % u dva režima rada bioreaktora: i) pri dinamičkoj kompresiji kada je brzina pomeraja osnove bioreaktora iznosila 337,5  $\mu\text{m/s}$ , i ii) pri stepenastom povećanju pomeraja osnove bioreaktora za 50  $\mu\text{m}$ , odnosno 75  $\mu\text{m}$  svakih 30 min.

Ispitivanja pakovanih slojeva Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra i kontrolnih 1,9 mas.% alginatnih mikročestica su imala za cilj da odrede uticaj prisustva nanočestica srebra na biomehaničke karakteristike. Pokazano je da se vrednosti dinamičkog i ravnotežnog modula elastičnosti dobijene iz nagiba linearnih zavisnosti napona od primenjene deformacije nisu međusobno statistički značajno razlikovale za različite koncentracije nanočestica ( $155 \pm 3$  kPa, odnosno  $34 \pm 0,4$  kPa). Sa druge strane, dinamički i ravnotežni moduli elastičnosti pakovanog sloja kontrolnih mikročestica su bili statistički značajno različiti od vrednosti za nanokompozitne mikročestice. Pri tome je vrednost dinamičkog modula od  $141 \pm 2$  kPa bila značajno niža, a vrednost ravnotežnog modula elastičnosti od  $45,2 \pm 0,2$  kPa značajno viša od odgovarajućih vrednosti određenih za pakovani sloj Ag/alginatnih mikročestica.

Blagi uticaj nanočestica srebra na mehaničke karakteristike pakovanog sloja alginatnih mikročestica je u skladu sa slabom interakcijom nanočestica sa polimernom mrežom, tako da fazna transformacija, termosenzitivnost i

viskoelastičnost polimernog gela ostaje nepromenjena (*Schexnailder i Schmidt, 2009*). Dobijeni rezultati upoređeni sa rezultatima dobijenim za čiste Ca-alginatne mikročestice ukazuju da pri dinamičkim uslovima nanočestice srebra dovode do većeg zadržavanja vode unutar matriksa hidrogela povećavajući na taj način dinamički modul elastičnosti. Međutim, kada hidrogel ima dovoljno vremena za relaksaciju dolazi do izražaja negativni efekat nanočestica na jačinu hidrogela snižavajući vrednost ravnotežnog modula elastičnosti. Ovi rezultati su u saglasnosti sa objavljenim efektima nanočestica u malim koncentracijama (< 1 mas.%) koje su bile inkorporisane unutar PVA hidrogela (*Mbhele i sar., 2003*). Pokazano je da dodavanje nanočestica srebra u koncentraciji od 0,19 mas.% dovodi do naglog povećanja modula elastičnosti hidrogela koji zatim ostaje konstantan iako se koncentracija nanočestica dalje povećava do 0,73 mas.%. Međutim, tokom relaksacije, Ag/PVA nanokompoziti su imali značajno niže vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti od čistog PVA hidrogela. Ovi rezultati su objašnjeni interakcijom nanočestica sa polimernim lancima što dovodi do povećanja čvrstoće. Međutim, tokom produženog opterećenja dolazi do razdvajanja nanočestica od polimernih lanaca što omogućava strukturno preuređivanje lanaca tokom relaksacije zbog čega su PVA/Ag nanokompoziti imali nižu vrednosti ravnotežnog modula elastičnosti u odnosu na kontrolni PVA hidrogel (*Mbhele i sar., 2003*).

Dobijene vrednosti modula elastičnosti pakovanog sloja 1,9 mas.% kontrolnih alginatnih mikročestica u ovom radu su nešto veće od vrednosti koje su u ranijim studijama određene za pakovani sloj 2 mas.% Ca-alginatnih mikročestica (dinamički modul elastičnosti od  $111,0 \pm 8,1$  kPa, i ravnotežni modul elastičnosti od  $31,6 \pm 0,4$  kPa) (*Stojkowska i sar., 2010*). Dobijene razlike se mogu objasniti različitom veličinom mikročestica korišćenih u ovom radu ( $550 \pm 20$   $\mu\text{m}$ ) u poređenju sa prethodnom studijom ( $780 \pm 30$   $\mu\text{m}$ ) jer manje čestice bolje zadržavaju vodu unutar samih intersticijalnih kanala, povećavajući module elastičnosti, kako je već ranije pokazano (*Stojkowska i sar., 2010*).

Na sličan način ispitane su biomehaničke karakteristike pakovanog sloja PVA/Ag/alginatnih čestica (prečnik  $\sim 1270 \mu\text{m}$ ) u poređenju sa pakovanim slojem kontrolnih 1,3 mas.% alginatnih čestica (prečnik  $\sim 1250 \mu\text{m}$ ). Dinamički moduli elastičnosti za ova dva sloja su bili značajno različiti odnosno od  $105 \pm 7 \text{ kPa}$  i  $51 \pm 2 \text{ kPa}$ , za PVA/Ag/alginatne čestice i kontrolne čestice, redom. S druge strane, nije uočena značajna statistička razlika između ravnotežnih modula elastičnosti pakovanih slojeva PVA/Ag/alginatnih čestica i alginatnih čestica odnosno  $15 \text{ kPa}$  i  $15,8 \text{ kPa}$ , redom. Dobijeni rezultati se mogu objasniti da pri dinamičkoj kompresiji dominantan uticaj na mehaničke karakteristike ima struktura hidrogelova, kao i voda zarobljena u porama hidrogela (*Wang i sar., 2005*), zbog čega je i vidljiva razlika u vrednostima dinamičkog modula elastičnosti između ova dva ispitivana pakovana sloja. Međutim, kada postoji dovoljno vremena za relaksaciju polimerne mreže hidrogela i uravnoteženja sadržaja vode, razlike između ispitivanih pakovanih slojeva se gube.

Treba primetiti da je poređenjem vrednosti modula elastičnosti pakovanih slojeva 1,9 mas.% alginatnih mikročestica (prečnik  $600 \pm 30 \mu\text{m}$ ) i 1,3 mas.% alginatnih mikročestica (prečnik  $\sim 1250 \mu\text{m}$ ) jasno uočljiv uticaj koncentracije alginata i prečnika mikročestica gde se povećanjem koncentracije i smanjenjem prečnika poboljšavaju mehaničke karakteristike što je i očekivano. Mogućnost poboljšanja biomehaničkih karakteristika nanokompozitnih hidrogelova je ispitana poređenjem vrednosti dobijenih u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom za PVA, PVA/Ag/alginatne i PVP/PVA/Ag/alginatne diskove. Pokazano je da samo dodavanje Ag/alginata u PVA dovodi do povećanja dinamičkog modula elastičnosti dobijenog hidrogela za oko 20 % ( $65 \pm 2 \text{ kPa}$  za PVA i  $79 \pm 1 \text{ kPa}$  za PVA/Ag/alginat), dok dodavanje PVP i Ag/alginata u PVA povećanja ovu vrednost za oko 77 % (odnosno  $115 \pm 4 \text{ kPa}$ ). Međutim nije uočena razlika između ravnotežnih modula elastičnosti PVA i PVA/Ag/alginatnih diskova ( $27,2 \text{ kPa}$  i  $26,7 \text{ kPa}$ , redom), dok je ravnotežni modul elastičnosti PVP/PVA/Ag/alginatnih diskova ( $43 \text{ kPa}$ ) i dalje bio značajno veći ( $\sim 1,6$  puta) od ravnotežnog modula elastičnosti PVA diska. Dobijeni rezultati ukazuju da alginat i nanočestice srebra interferiraju sa PVA polimernom mrežom otežavajući odgovor

na dinamičku kompresiju, međutim kada se obezbedi vreme za relaksaciju mreže, mehanička jačina nanokompozita i čistog PVA hidrogela nije značajno različita. Sa druge strane, efekat PVP na mehaničke karakteristike je vidljiv kako pri dinamičkim tako i pri ravnotežnim uslovima. Eksperimentalno određeni dinamički moduli elastičnosti su u saglasnosti sa literaturnim vrednostima za PVA i PVP hidrogelove dobijene metodom zamrzavanja i odmrzavanja i variraju od oko  $\sim 10$  kPa (Thomas i sar., 2003, Ma i sar., 2009) do  $\sim 230$  kPa (Joshi i sar., 2006) u zavisnosti od sastava hidrogela, broja ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja, primenjene deformacije i brzine kompresije.

Sledeći korak u *in vitro* karakterizaciji nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra je bio ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra. Citotoksičnost je ispitivana u 2D kulturama i to u suspenziji mononuklearnih ćelija periferne krvi i monosloju telećih hondrocita, kao i u 3D kulturi telećih hondrocita imobilisanih u alginatne mikročestice u perfuzionom bioreaktoru.

Citotoksičnost Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova za potencijalnu primenu u tretmanu rana je potrebno ispitati u kulturama ćelija koje su zastupljene u rani. Stoga je u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivana citotoksičnost odabranih hidrogelova u suspenziji mononuklearnih ćelija periferne krvi. Mononuklearne ćelije su limfociti i monociti, kao i makrofagi koji nastaju diferencijacijom monocita. Nakon 48 h od povrede monociti dospevaju u ranu, diferenciraju se u makrofage koji pomažu njeno ozdravljenje. U suspenziji mononuklearnih ćelija periferne krvi ispitivan je uticaj Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra na preživljavanje nestimulisanih ćelija i stimulisanih dodatkom fitohemoglutinina. Eksperimentalno dobijeni rezultati su ukazali da Ag/alginatne mikročestice, dobijene od Ag/alginatnih koloidnih rastvora sa različitim koncentracijama nanočestica srebra (0,5 mM do 1,5 mM), imaju slab citotoksičan efekat na mononuklearne ćelije periferne krvi. Treba napomenuti da su mononuklearne ćelije koje su bile stimulisane fitohemoglutininom bile nešto osetljivije od nestimulisanih ćelija, što je i očekivano



jer su ćelije u deobi osetljivije na spoljašnje faktore (*Valeriote i van Putten, 1975*). Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature (*Jovanović i sar., 2013*) gde je ispitana citotoksičnost nanočestica srebra unutar PVP hidrogela, u obliku diska (prečnik 8,4 mm, debljina 4,5 mm), dobijenih  $\gamma$  zračenjem PVA hidrogela koji je prethodno bubrio 24 h u rastvorima srebro nitrata različitih koncentracija u opsegu od 1 mM do 16 mM. Umeren citotoksični efekat je primećen kod gela koji je bubrio u 1 mM rastvoru srebro nitrata, dok su koncentracije rastvora od 2 mM i više imale jak citotoksični efekat na nestimulisane i stimulisane mononuklearne ćelije periferne krvi u suspenziji. Dobijeni rezultati ukazuju da je optimalna koncentracija nanočestica srebra u Ag/alginatnim mikročesticama <1 mM za potencijalnu primenu u tretmanu rana.

Ag/alginatni hidrogelovi imaju potencijalnu primenu i kao implantati za meka tkiva obezbeđujući sterilnu okolinu, kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima što zahteva ispitivanje citotoksičnosti prema ćelijama tkiva u koje će se implantirati. Stoga su u ovom radu i izabrani hondrociti jer je hrskavica jedno od potencijalnih mesta implantacije nanokompozitnih hidrogelova. U monosloju telećih hondrocita ispitivan je uticaj Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica (0,33-3,76 mM) i pri primeni različite mase mikročestica (0,3 g i 0,6 g). Eksperimentalni rezultati su pokazali da je preživljavanje ćelija zavisilo od koncentracije otpuštenog srebra (tabela 4.4 i slika 4.51). Merenje koncentracije jona srebra u fiziološkom rastvoru je pokazalo da nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji slobodnih jona srebra između svih ispitivanih uzoraka koja je iznosila  $\sim 0,5$   $\mu\text{g/ml}$ . Međutim, kada je merena koncentracija srebra nakon rastvaranja istaložene soli AgCl uočene su značajne razlike ukupno otpuštene količine srebra između grupa. Kada je koncentracija ukupnog otpuštenog srebra bila manja od 5  $\mu\text{g/ml}$  nije bilo značajnog uticaja na preživljavanje hondrocita, ali je pri porastu koncentracije otpuštenog srebra na 7  $\mu\text{g/ml}$  došlo do jakog citotoksičnog efekta. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa drugim studijama koje su ispitivale efekte različitih sistema koji sadrže nanočestice srebra na različite tipove ćelija sisara gde je citotoksičnost nanočestica srebra bila u opsegu koncentracija od 1,6 do 50  $\mu\text{g/ml}$  (*Hussain i sar., 2005, Park i sar., 2010*). Treba

naglasiti da je dobro poznato da citotoksičnost nanočestica srebra zavisi od koncentracije i veličine nanočestica, kao i od tipa ćelija koje su korišćene za ispitivanje (Kim i sar., 2012). Tako je naprimer pokazano da su mišiji preosteoblasti (MC3T3-E1) i ćelije adrenalne medule pacova, (PC12) osetljivije na nanočestice srebra nego humane ćelije cervikalnog kancera (HeLa) i ćelije ovariuma kineskog hrčka (CHO). Takođe je pokazano da manje nanočestice srebra (oko 10 nm) imaju snažniji citotoksični efekat u odnosu na nanočestice srebra prečnika 50 i 100 nm (Kim i sar., 2012).

Citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica je takođe ispitana pod *in vitro* uslovima koji imitiraju fiziološku okolinu u vaskularizovanom tkivu *in vivo*. Uspostavljena je 3D ćelijska kultura telećih hondrocita imobilisanih u alginatne mikročestice zajedno sa Ag/alginatnim mikročesticama (4,7 mM koncentracija nanočestica srebra) u perfuzionom bioreктору u toku 2 nedelje. Pokazan je blag citotoksični efekat na imobilisane hondrocite unutar alginatnog matriksa, jer je vijabilnost ćelija nakon 2 nedelje iznosila oko 78 %. Međutim, i u ovom slučaju je izmerena količina slobodnih jona srebra u fiziološkom rastvoru u analognom eksperimentu bez hondrocita bila zanemarljiva. Ukupna koncentracija otpuštenog srebra, izračunata na osnovu bilansa količine srebra u mikročesticama, je iznosila ~9,3 µg/ml., što je u opsegu jako citotoksičnih koncentracija za hondrocite u monosloju (>7µg/ml). Dobijeni rezultati ukazuju da se ćelije u monosloju mogu smatrati osetljivijim na nanočestice i jone srebra nego ćelije okružene alginatnim matriksom. Dobro je poznato da 2D ćelijska kultura ima nekoliko ograničenja u odnosu na *in vivo* sredinu kao što su gubitak trodimenzionalne strukture tkiva, izostanak interakcija ćelija sa ekstracelulatnim matriksom i između samih ćelija, kao i gubitak biofizičkih i biohemijskih signala (Mazzoleni i sar., 2009). Tako da ispitivanja citotoksičnosti u 2D kulturama ne mogu tačno da pokažu toksičnost nanočestica u telu (Lee i sar., 2009), pa su citotoksični efekti različitih agenasa izraženiji u 2D nego u 3D kulturama (Lee i sar., 2009, Movia i sar., 2011, Hashimoto i sar., 2014) što je i u ovoj studiji potvrđeno.

Kada su određene netoksične koncentracije nanočestica srebra u Ag/alginatnim mikročesticama sledeći korak je bio određivanje antimikrobne aktivnosti. Ispitane su vlažne i suve mikročestice u suspenzijama *S. aureus* i *E. coli* kao najčešće korišćenim modelima za Gram-pozitivne, odnosno Gram-negativne vrste bakterija. Eksperimentalno dobijeni rezultati su ukazali da oba tipa mikročestica, vlažne i suve, imaju isti efekat na obe ispitivane vrste bakterija (tabele 4.5 i 4.6). U analognim eksperimentima uz korišćenje fiziološkog rastvora određena je koncentracija otpuštenog srebra pri čemu se i ovde pokazalo da je koncentracije slobodnih jona zanemarljiva (~0,5 µg/ml). Međutim, koncentracije ukupnog srebra kao Ag<sup>+</sup> i AgCl su bile značajno veće i do ~10 µg/ml posle 24 h. Nešto niže koncentracije otpuštenog srebra su izmerene u suspenziji suvih mikročestica (~ 2,4 µg/ml) što nije u skladu sa uočenim sličnim antibakterijskim efektom. Ova razlika se može objasniti različitim poreklom alginata koji je korišćen za antibakterijska ispitivanja i ispitivanja otpuštanja srebra, jer je primećeno da alginat koji je korišćen za otpuštanje srebra sporije bubri i zato je verovatno došlo do manjeg otpuštanja srebra nego u bakterijskoj suspenziji. Dobijeni rezultati antimikrobne aktivnosti su u saglasnosti sa drugim studijama antibakterijske aktivnosti nanočestica srebra u različitim sistemima prema *S. aureus* i *E. coli*. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) nanočestica srebra su izmerene u opsegu 0,34-120 µg/ml za *S. aureus*, odnosno 0,26-180 µg/ml za *E. coli* (Panáček i sar., 2006, Ruparelia i sar., 2008, Valodkar i sar., 2011), u zavisnosti od oblika, veličine i površinske modifikacije nanočestica (Sondi i Salopek-Sondi, 2004, Morones i sar., 2005, Pal i sar., 2007, Marius i sar., 2011). Tako su Travan i saradnici (2009) pokazali baktericidnu aktivnost hitozan-alginatnih mikročestica sa inkorporisanim nanočesticama srebra prema *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, i *P. aeruginosa* koja je bila posledica antimikrobne aktivnosti kako nanočestica (Panáček i sar., 2009, Radzig i sar., 2013) tako i hitozana (Zheng i sar., 2003). Takođe, Ag/alginatni nanokompozitni suđeri (5,65 mM, prečnika 4,8 cm), dobijeni liofilizacijom Ag/alginatnog koloida, a zatim geliranjem u 0,2 M CaCl<sub>2</sub> rastvoru, pokazali su nakon 24 h inkubacije baktericidnu aktivnost prema *K. pneumoniae* i *S. aureus* (Seo i sar., 2012). Dobijena baktericidna aktivnost je objašnjena sinergističkim efektom zarobljavanja bakterija u porama unutar

alginatnog matriksa i direktnog kontakta sa nanočesticama srebra. Treba istaći da je u ovom radu, antimikrobna aktivnost Ag/alginatnih mikročestica zasnovana samo na otpuštanju nanočestica i/ili jona srebra. Takođe bi trebalo dodati da antibakterijski efekti zavise od količine primenjenog antimikrobnog agensa, kao i od početne koncentracije bakterija. Pokazano je da je rast *E. coli* inhibiran u većoj meri kada je inicijalna koncentracija bakterija bila manja i iznosila  $10^4$  tako da je posle 24 h inkubacije sa nanočesticama srebra koncentracije 20  $\mu\text{g/ml}$ , dok kada je koncentracija bakterija iznosila  $10^7$  nanočestice srebra u koncentraciji 100  $\mu\text{g/ml}$  su samo odložile rast bakterija (Sondi i Salopek-Sondi, 2004). Može se zaključiti da antimikrobnu aktivnost Ag/alginatnih mikročestica treba dalje proučavati pri različitim eksperimentalnim uslovima i prema različitim bakterijskim vrstama dok je u ovom radu pokazan osnovni princip antibakterijske aktivnosti vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikročestica zasnovana na otpuštanju nanočestica i/ili jona srebra.

Dodatni značajni parametar koji je određen u ovom radu je forma oslobođenog srebra, kako u studijama citotoksičnosti tako i u studijama antimikrobne aktivnosti. Joni hlora, koji se nalaze u telesnim tečnostima kao i u najčešće korišćenim medijumima za ćelijske kulture, reaguju sa nanočesticama i/ili jonima srebra pri čemu se formira slabo rastvorljiva so AgCl. Stoga, treba voditi računa da se napravi razlika između koncentracije i efekata slobodnih jona srebra i istaloženog AgCl. U ovom radu su efekti citotoksičnosti i antibakterijske aktivnosti povezani sa ukupnom koncentracijom otpuštenog srebra koja je bila za red veličine viša od koncentracije slobodnih jona srebra.

Iz navedenih istraživanja generalno se može pretpostaviti da su vlažne Ag/alginate mikročestice atraktivne za primenu u biomedicini kao komponente u tkivnom inženjerstvu i kao implantati za meka tkiva obezbeđujući sterilnu okolinu. Sa druge strane, suve Ag/alginate mikročestice se mogu primeniti kao antimikrobni puderi u tretmanu rana jer bi omogućile održavanje vlažnosti rane brzim bubrenjem alginatnog matriksa, kao i antibakterijski efekat usled oslobađanja nanočestica i/ili jona srebra.

Sledeći korak u ovoj doktorskoj disertaciji je bio ispitivanje funkcionalnosti odabranih nanokompozitnih hidrogelova u tretmanu rana na modelu opekotina II stepena kod miševa i pacova, a zatim i na modelu nekroze kod pacova. U ovu svrhu razvijeni su nanokompozitni hidrogelovi, u obliku mikrovlakana, koji najviše odgovaraju komercijalnim Ca-alginatnim oblogama sa jonskim srebrom, odnosno medom.

Ag/alginatna mikrovlakna su dobijena ekstruzionom tehnikom, a zatim su podvrgnuta sušenju kao bi se dobila suva Ag/alginatna mikrovlakna koja su veoma atraktivna za tretman rana sa obilnim eksudatom. Dobijena su mikrovlakna prečnika  $\sim 300 \mu\text{m}$ , dok je prečnik suvih mikrovlakna iznosio  $\sim 100 \mu\text{m}$  (slika 4.34). Pošto je prečnik komercijalnih Ca-alginatnih mikrovlakana značajno manji ( $\sim 15 \mu\text{m}$ ) u cilju smanjenja prečnika Ag/alginatnih mikrovlakana, tokom procesa ekstruzije vlakna su podvrgnuta istezanju primenom jednostavne laboratorijske aparature sa jednim kalemom. Time su dobijena mikrovlakna prečnika  $\sim 120 \mu\text{m}$ , dok je prečnik suvih mikrovlakana iznosio  $\sim 80 \mu\text{m}$  (slika 4.36). Može se pretpostaviti da bi u optimizovanom procesu istezanja sličnom industrijskoj proizvodnji bila dobijena Ag/alginatna mikrovlakna istih prečnika kao komercijala Ca-alginatna mikrovlakna. Koncentracije nanočestica srebra u vlažnim i suvim mikrovlaknima se nisu statistički značajno razlikovale, ali je dobijena značajno manja koncentracija nanočestica srebra u vlaknima dobijena sa istezanjem u odnosu na vlakna dobijena bez istezanja. Ovaj rezultat se može objasniti eksperimentalnom greškom ili većim varijacijama koncentracije nanočestica srebra u Ag/alginatnim mikrovlaknima dobijenim ovom tehnikom.

Na isti način dobijena su Ag/alginatna mikrovlakna sa medom ekstruzijom koloidnog rastvora sa nanočesticama srebra i meda u koncentracijama od 0,9 mM (0,0097 mas.%) i 50 mas.%, redom. U prvoj eksperimentalnoj seriji dobijena su mikrovlakna sa medom bez istezana prečnika oko  $400 \mu\text{m}$ , a njihovim sušenjem dobijena su suva mikrovlakna prečnika oko  $100 \mu\text{m}$  (slika 4.38). Primenom istezanja u drugoj eksperimentalnoj seriji dobijena su mikrovlakna prečnika  $\sim 170 \mu\text{m}$ , dok je prečnik suvih mikrovlakana iznosio  $\sim 80 \mu\text{m}$  (slika 4.40). U ovom

slučaju se koncentracija nanočestica srebra nije značajno razlikovala između vlažnih i suvih mikrovlakana, kao ni između eksperimentalnih serija i iznosila je oko 1,16 mM.

Kao što je već rečeno, funkcionalnost Ag/alginatnih mikrovlakana je ispitana na dva modela rana kod *Wistar* pacova: termičkih opekotina II stepena (78,5 mm<sup>2</sup>) i nekroza (63,4 mm<sup>2</sup>) indukovanih doksorubicinom. Takođe, funkcionalnost Ag/alginatnih mikrovlakna sa medom je ispitana i na modelu termičkih opekotina II stepena (25 mm<sup>2</sup>) kod miševa (*Mus musculus*), kao i na modelu nekroze kod *Wistar* pacova (63,4 mm<sup>2</sup>). Zarastanje rana je upoređeno sa netretiranim kontrolnim grupama i grupama tretiranim komercijalnim preparatima na bazi kalcijum-alginata i jonskog srebra, odnosno meda i to u odnosu na brzinu zarastanja i histopatološku analizu.

Rezultati ispitivanja na modelu opekotina kod pacova su pokazali da je došlo do značajno bržeg zarastanja rana kod životinja koje su bile tretirane 1,5 mM (0,0162 mas.%) vlažnim Ag/alginatnim mikrovlaknima (prečnik ~300 µm), 1,6 mM (0,0173 mas.%) suvim Ag/alginatnim mikrovlakna (prečnik ~100 µm), kao i komercijalnom oblogom na bazi suvih Ca-alginatnih mikrovlakana (prečnik ~15 µm) i jona srebra u koncentraciji od  $7,24 \pm 0,37$  mas.%, u odnosu na netretiranu kontrolu. Histopatološka analiza je pokazala povećanje granulacionog tkiva i reepitelizacije, smanjenje inflamacije i bolju organizaciju ekstracelularnog matriksa u svim tretiranim grupama. Na osnovu makroskopskih rezultata i histopatološke analize može se zaključiti da su Ag/alginatna mikrovlakna, vlažna i suva, pokazala statistički ekvivalentne rezultate kao komercijalna Ca-alginatna obloga sa jonskim srebrom iako je količina srebra naneta na ranu bila oko 100 puta manja (0,035 mg u odnosu na 1,74 mg). Takođe treba istaći da je proces dobijanja komercijalnih obloga za rane u potpunosti optimizovan kao i da je prečnik vlakana komercijalne obloge oko 7, odnosno 20 puta manji od prečnika suvih i vlažnih Ag/alginatnih mikrovlakana, redom. Optimizacijom procesa proizvodnje, a samim tim i smanjenjem prečnika mikrovlakana, moglo bi se očekivati poboljšanje funkcionalnosti Ag/alginatnih mikrovlakana. Dobijeni rezultati su takođe u skladu

sa podacima iz literature (*Tian i sar., 2007*), gde je praćeno zarastanje termičkih opekotina na leđima pacova ( $600 \text{ mm}^2$ ) u grupi tretiranoj komercijalnom oblogom sa nanočesticama srebra u koncentraciji od 0,275 mas.% (*Anson Nanotechnology Group Co., Ltd. Hong Kong*) i netretiranoj kontroli. Rane su svakodnevno tretirane sa po 0,48 mg srebra. Do potpunog zarastanja opekotine je došlo nakon  $26,5 \pm 0,9$  dana u tretiranoj grupi, dok je do spontanog zarastanja u kontrolnoj grupi došlo nakon  $35,4 \pm 1,3$  dana. Treba naglasiti da je u ovoj studiji korišćeno oko 2 puta više nanočestica srebra u odnosu na eksperimentalna ispitivanja u ovoj doktorskoj disertaciji ( $0,08 \text{ mg/cm}^2$  u odnosu na  $0,045 \text{ mg/cm}^2$ ), kao i da je korišćena komercijalna obloga u prethodnim istraživanjima u potpunosti optimizovana.

U ovom radu je ispitana i efikasnost suvih Ag/alginatnih mikrovlakna i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom na modelu nekroze kod pacova. Rana kože hroničnog karaktera (nekroza) je indukovana intradermalnim ubrizgavanjem doksorubicina kako je opisano u literaturi (*Kesik i sar., 2010*). Pokazano je da primenom ove metode nakon 14 dana od indukcije, hronične rane dostižu maksimalnu površinu od  $54 \text{ mm}^2$  ( $46\text{-}66 \text{ mm}^2$ ) što je dobijeno i u ovom radu. Međutim, praćenje spontanog zarastanja rana u dve kontrolne grupe je pokazalo da su postojale značajne razlike između grupa. Površine rana 14 dana nakon indukcije su bile značajno različite ( $68 \pm 9,3 \text{ mm}^2$  i  $60,7 \pm 9,6 \text{ mm}^2$ ), dok je kontrakcija rana bila nešto brža u prvoj kontrolnoj grupi. Međutim, na kraju ispitivanog perioda nije bilo statistički značajnih razlika između površina rana ispitivanih grupa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je model nekroze komplikovan i da proces razvijanja hronične rane nije dovoljno kontrolisan tako da iziskuje dodatna ispitivanja na većem broju životinja.

U ovim ispitivanjima kod životinja koje su bile tretirane 0,6 mM (0,0065 mas.%) suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (prečnik  $\sim 80 \text{ }\mu\text{m}$ ), 1,2 mM (0,0129 mas.%) Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (prečnik  $\sim 80 \text{ }\mu\text{m}$ ), kao i komercijalnom oblogom na bazi alginata i jona srebra (prečnik  $\sim 15 \text{ }\mu\text{m}$ , koncentracija jona srebra 7,24 mas.%) i komercijalnom oblogom na bazi alginata i meda nije bilo značajnih statističkih razlika u odnosu na netretirane kontrolne

grupe. Međutim, u netretiranoj kontroloj grupi, kao i u grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom je došlo do mešovite infekcije rana. Treba naglasiti da je i ovde količina srebra naneta na rane u grupama tretiranim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa i bez meda bila 100 puta manja nego u grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (0,035 mg u odnosu na 1,74 mg). Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalnu primenu Ag/alginatnih mikrovlakna sa i bez meda u tretmanu nekrotičnih rana u cilju sporečavanja infekcije koja predstavlja glavni uzrok produženog zarastanja rana.

U *in vivo* ispitivanjima, na modelu opekotina kod miševa, kod životinja koje su bile tretirane 1,2 mM (0,0129 mas.%) suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (prečnik ~100  $\mu\text{m}$ ), kao i komercijalnom oblogom na bazi alginata i meda (prečnik ~15  $\mu\text{m}$ ), došlo je do značajno bržeg zarastanja rana u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. Iako nije bilo statistički značajnih razlika u brzini zarastanja rana između tretiranih grupa, nešto brže zarastanje uz najmanje površine rana je dobijeno u grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom. Treba takođe istaći da je histopatološka analiza pokazala da je jedino u grupi tretiranoj Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom došlo do potpunog formiranja i diferencijacije skeletnih mišićnih vlakana, dok se u ostalim ispitivanim grupama i dalje uočavao proces regeneracije. Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalnu primenu Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom u regeneraciji skeletnih mišićnih vlakana, kao i da je neophodno uraditi dodatna ispitivanja kako bi se utvrdilo da li postoji sinergistički efekat Ag/alginata i meda na zarastanje rana.

Rezultati *in vivo* ispitivanja na modelu opekotina kod miševa i pacova, kao i na modelu nekroze kod pacova ukazuju na potencijalu primenu nanokompozita na bazi alginata i nanočestica srebra u tretmanu rana. Međutim, da bi sa sigurnošću govorili o efektima Ag/alginatnih nanokompozita u tretmanu različitih rana potrebno je uraditi *in vivo* ispitivanja na značajno većem broju životinja.



## 6. ZAKLJUČAK

Razvoj novih biomaterijala za biomedicinsku primenu zahteva različita ispitivanja i karakterisanja biomaterijala kako sa stanovišta hemijskog sastava i fizičkih svojstava, tako i u pogledu biokompatibilnosti i funkcionalnosti. Pri primeni nanomaterijala je još od posebnog značaja ispitivanje citotoksičnosti i interakcija nanočestica i ćelija i tkiva. Uz to, da bi se razvio optimizovan biomaterijal potrebno je rezultate svih ispitivanja povezati i objasniti radi mogućnosti pouzdanog predviđanja ponašanja i funkcije biomaterijala u željenoj primeni. Sa tog stanovišta razvoj novih nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra za potencijalnu biomedicinsku primenu zahteva različita ispitivanja u *in vitro* uslovima, kao što su ispitivanje citotoksičnosti, biomehaničkih karakteristika, antimikrobne aktivnosti i kinetike otpuštanja srebra, a zatim i ispitivanje funkcionalnosti u *in vivo* uslovima.

U ovoj doktorskoj disertaciji je prvo ispitana stabilnost koloidnih rastvora alginata sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama srebra, kao i ispitivanje stabilnosti nanočestica srebra u blago kiseloj sredini pogodnoj za primenu u tretmanu rana. Zatim je ispitana mogućnost mešanja Ag/alginatnih koloidnih rastvora sa različitim polimerima, kao i mogućnost dobijanja nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata različitih sastava i geometrijskih oblika kao što su diskovi, mikročestice i mikrovlakna. Takođe je ispitivana mogućnosti sušenja i rehidratacije nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata uz očuvanje inkorporisanih nanočestica srebra. Sledeći korak je bio sveobuhvatna karakterizacija nanokompozitnih hidrogelova u *in vitro* uslovima gde su za odabrane uzorke određene: biomehaničke karakteristike u biomimičnim bioreaktorskim uslovima, citotoksičnost u 2D ćelijskim kulturama i u biomimičnim uslovima tokom gajenja u bioreaktoru, kao i antimikrobna aktivnost. Na kraju je ispitana funkcionalnosti nanokompozitnih biomaterijala u *in vivo* uslovima to jest određena je efikasnosti odabranih nanokompozitnih biomaterijala na bazi alginata i nanočestica srebra za zarastanje rana na modelu opekotina II stepena kod miševa i pacova, kao i na modelu nekroze kod pacova.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci.

- Elektrohemijском sintezom uspešno su sintetisane sferične nanočestice u alginatnom rastvoru koje su stabilne oko 30 dana. Pokazano je da se aktivan rast odvija mehanizmom agregacije prva 3 dana, nakon čega sledi sporije Ostvaldovo sazrevanje.
- Jednostavnim razblaživanjem elektrohemijски sintetisanih Ag/alginatnih koloidnih rastvora rastvorom Na-alginata dobijaju se stabilni koloidni rastvori sa očuvanim nanočesticama srebra u koncentraciji koja je proporcionalna razblaženju.
- Ag/alginatni koloidni rastvori se mogu jednostavno sterilisati kuvanjem bez narušavanja stabilnosti nanočestica srebra.
- pH vrednost Ag/alginatnog koloidnog rastvora u ovom radu je snižena dodavanjem askorbinske kiseline, odnosno meda. Koloidni rastvor sa dodatkom askorbinske kiseline je bio stabilan oko 7 dana, ali je stabilnost nanočestica očuvana u toku 3 nedelje u rastvorima sa dodatkom meda u opsegu od 5-50 mas.%. Pri tome je Ag/alginatni koloidni rastvor sa 40 mas.% meda imao pH vrednost oko 5,5 koja je približna pH vrednosti komercijalnih preparata koji se koriste u iste svrhe.
- Ag/alginatni koloidni rastvori lako mogu se mešati sa PVA i PVP rastvorima uz očuvanje nanočestica srebra.
- Ag/alginatni koloidni rastvor je u tretmanu opekotina II stepena kod *Wistar* pacova pokazao statistički ekvivalentne rezultate kao komercijalna krema na bazi srebro sulfodiazina iako je količina srebra naneta na ranu bila oko 100 puta manja (0,013 mg u odnosu na 1,55 mg). Pri tome je period zarastanja rana u tretiranim grupama bio kraći nego kod kontrolne netretirane grupe (21 dan u odnosu na 25 dana, redom).
- Elektrostatičkom ekstruzijom Ag/alginatnih koloidnih rastvora su uspešno dobijene Ag/alginatne mikročestice pri čemu su nanočestice srebra ostale očuvane tokom manipulacije i geliranja Ag/alginatnog

koloidnog rastvora. Ag/alginate mikročestice imaju veću koncentraciju nanočestica srebra za oko 20 % u poređenju sa koloidnim rastvorom iz koga su dobijene. Prisustvo nanočestica srebra u koloidnim rastvorima nije imalo uticaj na veličinu dobijenih Ag/alginatnih mikročestica već je veličina mikročestica zavisila od vrednosti primenjenog elektrostatičkog napona tokom ekstruzije.

- Iz smeša Ag/alginatnih koloidnih rastvora i rastvora polimera kao i meda mogu se dobiti kompozitni hidrogelovi složenijeg sastava. Tako su elektrostatičkom ekstruzijom uspešno dobijene PVA/Ag/alginate čestice i Ag/alginate mikročestice sa medom, pri čemu su PVA/Ag/alginate čestice dodatno gelirane ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja. U oba slučaja nanočestice srebra su ostale očuvane tokom čitavog procesa proizvodnje čestica.
- Ispitivanja sušenja i rehidratacija Ag/alginatnih mikročestica su pokazala da je nakon sušenja očuvano oko 80-85 % inicijalnih nanočestica, dok hidrogel zadržava kapacitet bubrenja i otpuštanja nanočestica i jona srebra.
- Ispitivanja biomehaničkih karakteristika u biomimičnom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom su pokazala da inkorporisane nanočestice srebra blago utiču na biomehaničke karakteristike pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica tako što ojačavaju gel pri dinamičkoj kompresiji za oko 9 % ( $155 \pm 3$  kPa i  $141 \pm 2$  kPa, redom). Verovatno interakcijama sa molekulima vode i polimernim lancima. Međutim, tokom produženog dejstva opterećenja ovaj efekat se gubi tako da je ravnotežni modul elastičnosti niži za oko 24 % u odnosu na kontrolni pakovani sloj Ca-alginatnih mikročestica ( $34 \pm 0,4$  kPa i  $45,2 \pm 0,2$  kPa, redom).
- Pakovani sloj PVA/Ag/ alginatnih čestica je u biomimičnom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom ispoljio čak 2 puta veći dinamički modul elastičnosti nego pakovani sloj kontrolnih alginatnih mikročestica ( $105 \pm 7$  kPa i  $51 \pm 2$  kPa, redom), dok se vrednosti ravnotežnih modula elastičnosti nisu statistički razlikovali ( $\sim 15$  kPa). Dobijeni rezultati

ukazuju na razlike u strukturi ovih hidrogelova koje dolaze do izražaja pri dinamičkom opterećenju.

- Ispitivanja biomehaničkih karakteristika PVA, PVA/Ag/alginatnih i PVP/PVA/Ag/alginatnih diskova u biomimičnom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom su pokazala da pri dinamičkim uslovima dodatak Ag/alginata dovodi do blagog ojačavanja PVA diska (sa 65 kPa, na  $79 \pm 1$  kPa), dok je taj efekat pri ravnotežnim uslovima zanemarljiv ( $\sim 27$  kPa). Međutim, dodavanje i PVP značajno poboljšava mehaničke karakteristike koje su uočljive kako pri dinamičkoj kompresiji ( $\sim 115$  kPa) tako i u ravnotežnim uslovima kompresije ( $\sim 43$  kPa).
- Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra u suspenzijama mononuklearnih ćelija periferne krvi, sa i bez dodatka stimulanisa fitohemoglutininina je pokazalo blagi citotoksični efekti kada su Ag/alginatne mikročestice dobijene od Ag/alginatnih kolidnih rastvora sa koncentracijama nanočestica u opsegu od 0,5 mM do 1,5 mM. Pri tome su stimulisane ćelije bile nešto senzitivnije na prisustvo Ag/alginatnih mikročestica, ali razlike nisu bile statistički značajne.
- Ispitivanje citotoksičnosti na telećim hondrocitima u monosloju i u 3D ćelijskoj kulturi u perfuzionom bioreaktoru je pokazalo da su hondrociti u monosloju osetljiviji na nanočestice i jone srebra u poređenju sa hondrocitima imobilisanim u alginatne mikročestice. Kada je koncentracija ukupnog otpuštenog srebra iznosila 5  $\mu\text{g/ml}$  nije zapažen citotoksični efekat, dok su koncentracije od 7  $\mu\text{g/ml}$  i više imale jak citotoksičan efekat na ćelije u monosloju. Međutim, koncentracija otpuštenog srebra od  $\sim 9$   $\mu\text{g/ml}$  u bioreaktorskoj kulturi nije značajno uticala na vijabilnost imobilisanih ćelija.
- Vlažne i suve mikročestice su pokazale sličnu antibakterijsku aktivnost prema odabranim gram pozitivnim (*Staphylococcus aureus* TL) i gram negativnim bakterijama (*Escherichia coli* ATCC 25922). Pri tome je koncentracija ukupnog otpuštenog srebra iznosila 10  $\mu\text{g/ml}$  što je izazvalo odlaganje rasta bakterija.

- U cilju dobijanja potencijalno komercijalnih obloga za tretman rana ekstruzionom tehnikom su uspešno dobijena Ag/alginatna mikrovlakna, kao i Ag/alginatna mikrovlakna sa medom.
- U modelu opekotina II stepena kod *Wistar* pacova grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom, vlažnim Ag/alginatnim mikrovlaknima i suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima su zarastale značajno brže od netretiranih (19 dana u odnosu na 25 dana). Ag/alginatna mikrovlakna su pokazala statistički ekvivalentne rezultate kao komercijalne obloge iako je količina srebra naneta na ranu bila oko 100 puta manja.
- U modelu nekroze kod *Wistar* pacova grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom, komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom, suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima i suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom nisu pokazale značajne statističke razlike u brzini zarastanja rana. Ono što treba istaći je da je model nekroze komplikovaniji i stoga ga je potrebno izvoditi na većem broju životinja.
- U modelu opekotina kod miševa sve tretirane rane su zarastale značajno brže od netretiranih. Pokazano je da je samo u grupi tretiranoj Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom došlo do potpunog formiranja i diferencijacije skeletnih mišićnih vlakana.

Dobijeni rezultati su ukazali na potencijalnu primenljivost alginatnog koloidnog rastvora sa elektrohemijski sintetisanim nanočesticama usled stabilnosti nanočestica srebra, mogućnosti sterilizacije, kao i dobijanja rastvora različitih koncentracija nanočestica srebra jednostavnim razblaživanjem. Pri tome se upotrebom alginata odgovarajućeg sastava, kao i optimizacijom elektrohemijske sinteze očekuje produženje stabilnosti nanočestica srebra. Iz svih koloidnih rastvora, smeša sa drugim polimerima kao što su PVA i PVP, kao i smeša sa medom mogu se dobiti nanokompozitni hidrogelovi primenom jednostavnih tehnika geliranja. Poređenje rezultata ispitivanja citotoksičnosti i antibakterijske aktivnosti u sprezi sa ispitivanjima otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra je ukazalo na

mogućnost optimizacije sastava i oblika kompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra radi postizanja antimikrobnog efekta bez uticaja na okolno tkivo. Najzad, *in vivo* ispitivanja su ukazala na efikasnost Ag/alginatnog koloidnog rastvora i hidrogelova u tretmanu rana i to posebno na mogućnost poboljšanja funkcionalnosti dodatkom meda. Naredna ispitivanja treba da pokažu da li postoji sinergistički efekat Ag/alginata i meda na zarastanje rana.

Generalno, ova doktorska disertacija je pokazala značaj kombinacije različitih istraživanja i aspekata da bi se ispitala funkcionalnost novih biomaterijala, kao i da bi se evaluirao njihov potencijalni kapacitet za primenu u medicinskoj praksi. U ovom radu je pokazan potencijal novih nanokompozitnih biomaterijala na bazi nanočestica srebra i alginata, u obliku rastvora i hidrogelova za biomedicinsku primenu kao komponente za inženjerstvo tkiva ili implantati za meka tkiva, a posebno kao antimikrobne obloge za lečenje površinskih, ali i dubokih, nekrotičnih rana.

## 7. PRILOG

### 7.1. SPISAK SLIKA

- Slika 1.1.** Molekulske formule  $\beta$ -D-manuronske kiseline (M jedinica),  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G jedinica) i natrijum alginata.....**3**
- Slika 1.2.** Vezivanje  $\text{Ca}^{2+}$  jona za alginatne lance: A) "egg-box" model (model kutije za jaja) vezivanja jona kalcijuma u šupljine između GG segmenata; B) jonske interakcije sa karboksilnim grupama u MM blokovima (*Bajpai i Sharma, 2004*).....**5**
- Slika 1.3.** Heliks Ca-poli- $\alpha$ -L-guluronata: A) pogled duž ose sa prikazom vodoničnih veza i mesta vezivanja jona kalcijuma; B) pogled normalno na osu.....**5**
- Slika 1.4.** Princip formiranja kapi primenom elektrostatičke ekstruzije. Na vrh pozitivno naelektrisane igle dovodi se rastvor polimera. Električno polje se formira između pozitivne igle i uzemljenog rastvora za geliranje. Na kap na vrhu igle deluje sila gravitacije ( $F_g$ ) i elektrostatička sila ( $F_e$ ) koje teže da otkinu kap nasuprot sili površinskog napona ( $F_\gamma$ ).....**9**
- Slika 1.5.** Šematski prikaz nastajanja čestica hidrogela ekstruzijom. A) Ekstruzija bez dejstva električnog polja: pod pritiskom  $p$  rastvor polimera se potiskuje kroz kapilaru poluprečnika  $r_0$  pri čemu se formira kap na koju deluje sila gravitacije ( $mg$ ), dok na meniskus deluje sila površinskog napona; pri izjednačavanju ove dve sile dolazi do otkidanja kapi poluprečnika  $r_1$  koja pada u rastvor za geliranje gde očvršćuje u česticu. B) Elektrostatička ekstruzija: pod pritiskom  $p$  rastvor polimera se potiskuje kroz kapilaru poluprečnika  $r_0$  pri čemu se formira kap na koju deluju sila gravitacije ( $mg$ ) i elektrostatička sila ( $F_e$ ), dok na meniskus deluje sila površinskog napona; pri izjednačavanju gravitacione i elektrostatičke sile sa silom površinskog napona otkida se kap poluprečnika  $r_2$  koja pada u rastvor za geliranje gde očvršćuje u česticu.....**11**

<b>Slika 1.6.</b> Dobijanje poli(vinil alkohola) polimerizacijom vinil acetata, praćene hidrolizom poli(vinil acetata).....	<b>14</b>
<b>Slika 1.7.</b> Šematski prikaz formiranja kriogela metodom ponovljenih ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. A) Početni rastvor se sastoji od makromolekula polimera (1) i rastvaraća (2). B) Tokom zamrzavanja stvaraju se kristali rastvaraća (3), dok se u mikrofazi tečnosti koja ne zamrzava povećava koncentracija polimera koji se onda fizički umrežavaju (4). C) Nakon odmrzavanja uočava se okosnica kriogela (5), makropore (6) i rastvarač (7) ( <i>Lozinsky i sar., 2003</i> ).....	<b>16</b>
<b>Slika 1.8.</b> Dobijanje PVP polimerizacijom N-vinil-2-pirolidona.....	<b>17</b>
<b>Slika 1.9.</b> TEM mikrografije nanoćestica srebra razlićitih oblika: A) sferićne nanoćestice ( <i>Pal i sar., 2007</i> ); B) trouglaste nanoćestice; C) nanožice; D) kockaste nanoćestice ( <i>Yu i Yam, 2005</i> ).....	<b>19</b>
<b>Slika 1.10.</b> Šematski prikaz mehanizma formiranja i rasta nanoćestica srebra u toku vremena. Najmanji krugovi predstavljaju primarne nanokristale, dok najveći oznaćavaju rastuće nanoćestice. $\bar{V}$ (t) je srednja zapremina nanoćestica u toku vremena, $k_g$ je konstanta agregacionog rasta, $k_0$ je konstanta brzine Ostvaldovog sazrevanja ( <i>Richards i sar, 2010</i> ).....	<b>23</b>
<b>Slika 1.11.</b> Hondrociti u lakunama okruženi ekstracelularnim matriksom.....	<b>28</b>
<b>Slika 1.12.</b> Intervertebralni disk, izgrađen od unutrašnjeg dela <i>nucleus pulposus</i> ili jezgro, i spoljašnjeg dela <i>annulus fibrosus</i> -fibrozni prsten, sa kićmenim kanalom.....	<b>29</b>
<b>Slika 1.13.</b> Prikaz organizacije tkiva kosti: A) kompaktno tkivo kosti, B) i sunderasto tkivo kosti.....	<b>31</b>



**Slika 1.14.** Čelije su izložene različitim fizičkim signalima usled mehaničkog opterećenja tkiva. A) Istezanjem ili kompresijom matriksa tkiva fizički signali se prenose do ćelija preko mesta adhezije ćelija i matriksa. B) Usled porasta pritiska intersticijalne tečnosti tkiva ćelije su izložene hidrostatičkom pritisku. C) Usled proticanja intersticijalne tečnosti tkiva na ćelijsku membranu deluje hidrodinamički tangencijalni napon (*Raimondi, 2006*) .....**32**

**Slika 1.15.** Osnovni koncept inženjerstva tkiva se sastoji od: izolacija ćelije iz donora (1), proliferacije izolovanih ćelija (2), sejanja ćelija na nosače (3), i od gajenja ćelija zasejanih na nosače (4). Nakon *in vitro* gajenja sledi implantacija dobijenog tkivnog ekvivalenta (5) (*George, 2011*) .....**34**

**Slika 1.16.** Različiti tipovi bioreaktora: A) sud bez mešanja; B) sud sa mešanjem i prikaz turbulentnog strujanja oko nosača sa ćelijama; C) rotacioni bioreaktor i prikaz nosača sa ćelijama u stanju dinamičke ravnoteže gde deluju: gravitaciona sila ( $F_g$ ), centrifugalna sila ( $F_c$ ) i sila trenja ( $F_{tr}$ ); D) perfuzioni bioreaktor; E) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom tkiva; F) bioreaktor sa perfuzijom i dinamičkom kompresijom.....**38**

**Slika 1.17.** Akumulacija koštanih proteina i mineralizovanog matriksa. OCN-osteokalcin; OPN-osteoponin, COL I- kolagen I i MICRO-mineralizovani matriks (razmernik 1 mm) (*Grayson i sar., 2011*).....**40**

**Slika 1.18.** Građa kože: višeslojni epidermis odvojen od dermisa bazalnom membranom i hipodermis najdublji sloj kože.....**44**

**Slika 1.19.** Proces spontanog ozdravljenja rane. A i B) Hemostaza-odmah nakon povrede: trombociti zaustavljaju krvarenje i uočava se prisustvo neutrofila i makrofaga. C) Faza rane inflamacije kada su u oštećenom tkivu dominantni neutrofilni. D) Faza kasne inflamacije kada su u oštećenom tkivu dominantni makrofagi. E) Faza proliferacije u kojoj fibroblasti sintetišu komponente vanćelijskog matriksa. F) Faza maturacije ili remodelovanja u kojoj se odvija reorganizacija vanćelijskog matriksa (*Beanes i sar., 2003*) .....**47**

**Slika 1.20.** Tipična zavisnost napona od primenjene deformacije alginatnog hidrogela u obliku diska. Prikazane su vrednosti parametara ( $\sigma_f$ , napon pri lomu;  $W_f$ , energija loma;  $E$ , Jangov modul elastičnosti) za alginatne diskove (2 mas.%) dobijene geliranjem u 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  na  $4^\circ\text{C}$  u toku 2 h. Određivanje Jangovog modula elastičnosti u linearnoj oblasti krive napona u zavisnosti od primenjene deformacije ( $\leq 10\%$ ) je prikazano u insertu A (Junter i Vinet, 2009).....**56**

**Slika 3.1.** Šematski prikaz eksperimentalne aparature za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra: u elektrohemijskoj ćeliji sa vodenim rastvorom  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{AgNO}_3$ , i Na-alginata se nalaze radna Pt elektroda, pomoćna Pt elektroda i zasićena kalomelova elektroda (ZKE) kao referentna elektroda. Galvanostatska sinteza je izvedena u elektrohemijskoj ćeliji uz stalno mešanje vodenog rastvora i atmosfere azota.....**62**

**Slika 3.2.** Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije: koloidni rastvor natrijum-alginata sa nanočesticama srebra se potiskuje uz pomoć infuzione pumpe kroz pozitivno naelektrisanu iglu povezanu sa pozitivnom elektrodom izvedenom iz generatora visokog napona, a nastale kapljice se skupljaju u uzemljenom rastvoru  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  mešanom na magnetnoj mešalici. Između vrha igle i rastvora  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  se stvara električno polje, pa se rastvor, potiskivan pumpom kroz špric, od vrha igle otkida u obliku mlaza sitnih naelektrisanih kapljica pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile. U rastvoru za geliranje dolazi do razmene jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  i očvršćavanja kapi u obliku sferičnih čestica .....**67**

**Slika 3.3.** Šematski prikaz eksperimentalne aparature za dobijanje mikrovlakana. A) Ag/alginatni koloidni rastvor se potiskuje uz pomoć peristaltičke pumpe kroz iglu koja je iznad rastvora  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Nastali mlaz u rastvoru  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  očvršćava formirajući mikrovlakna. B) Ag/alginatni koloidni rastvor se potiskuje uz pomoć peristaltičke pumpe kroz iglu koja je uronjena u rastvor  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Nastali mlaz očvršćava formirajući mikrovlakna koja se namotavaju na kalem i istežu se.....**70**

**Slika 3.4.** Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom. A) Nosač sa 6 komora je postavljen na osnovu koju pokreće step motor pričvršćen ispod osnove; opterećenje se meri senzorom opterećenja pričvršćenim ispod nosača komora. B) Šematski prikaz bioreaktorske komore sa priključcima za dovod i odvod medijuma u koju se smešta uzorak na sinterovano staklo i zatvara dijafragmom na koju naleže klip mikrometarski zavrtnj.....72

**Slika 3.5.** Šematski prikaz izolacije ćelija i studije citotoksičnosti. A) Studija citotoksičnosti u suspenziji humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi sa Ag/alginatnim mikročesticama: mononuklearne ćelije su izolovane iz pune heparinizovane krvi centrifugiranjem u gradijentu koncentracije pomoću separatora. B) Studije citotoksičnosti u monosloju hondrocita sa Ag/alginatnim mikročesticama: hondrociti su izolovani iz femuropatelarnih zglobova telića.....75

**Slika 3.6.** Šematski prikaz izolacije hondrocita i studije citotoksičnosti u 3D bioreaktorskom gajenju: hondrociti su imobilisani u alginatne mikročestice elektrostatičkom ekstruzijom i gajeni u perfuzionom bioreaktoru u prisustvu Ag/alginatnih mikročestica.....79

**Slika 3.7.** Šematski prikaz eksperimentalnog bioreaktorskog sistema. Medijum se transportuje iz rezervoara za medijum u duži namotaj creva, koji služi za razmenu gasova, pomoću višekanalne perilstatičke pumpe, a zatim u komoru za gajenje i vraća u rezervoar. Špricevi ispred i iza komore služe za izvlačenje mehurića gasa iz medijuma, kao i za izmenu medijuma.....80

**Slika 4.1.** Apsorpcioni spektri elektrohemijski sintetisanog Ag/alginatnog koloidnog rastvora, sa koncentracijom nanočestica srebra i Na-alginata od 3,9 mM i 1,9 mas.%, redom, i 1,9 mas.% Na-alginata (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 15\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji); insert: TEM mikrofotografija elektrohemijski sintetisanih nanočestica srebra u Ag/alginatnom koloidnom rastvoru (razmernik: 50 nm).....98

<b>Slika 4.2.</b> Zavisnost intenziteta apsorbance na talasnoj dužini od 405 nm za 3,9 mM Ag/alginatni koloidni rastvor od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja) .....	<b>99</b>
<b>Slika 4.3.</b> Zavisnost intenziteta maksimalne apsorbance merene na talasnoj dužini od 405 nm od vremena za 3,9 mM Ag/alginatni koloidni rastvor (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja) .....	<b>100</b>
<b>Slika 4.4.</b> Apsorpcioni spektri 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora nakon 5 dana, 2, 4 i 10 meseci od elektrohemijske sinteze (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 10\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji) .....	<b>101</b>
<b>Slika 4.5.</b> Zavisnost pH vrednosti od vremena za 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja) .....	<b>102</b>
<b>Slika 4.6.</b> Apsorpcioni spektri elektrohemijski sintetisanog 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora i 1,4 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora dobijenog razblaživanjem početnog koloidnog rastvora (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 15\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji) .....	<b>103</b>
<b>Slika 4.7.</b> Apsorbanca Ag/alginatnih koloidnih rastvora dobijenih razblaživanjem početnog 3,9 mM koloidnog rastvora dodavanjem 1,9 mas.% rastvora Na-alginata merena na talasnoj dužini od 405 nm, kao funkcija izračunate koncentracije nanočestica srebra u rastvoru (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja) .....	<b>104</b>
<b>Slika 4.8.</b> Apsorpcioni spektri elektrohemijski sintetisanog 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora pre i posle sterilizacije ključanjem od 30 min (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 15\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji) .....	<b>105</b>

- Slika 4.9.** Apsorpcioni spektri rastvora askorbinske kiseline koncentracije 0,1 mg/ml i meda (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 18\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji)....**106**
- Slika 4.10.** Početni apsorpcioni spektri 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora, 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 0,1 mg/ml askorbinskom kiselinom, 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 20 i 40 mas.% meda (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji) .....**108**
- Slika 4.11.** Zavisnosti pH vrednosti i vrednosti maksimalnog intenziteta apsorbanace 1 mM Ag/alginatnog koloidnog od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 9 merenja) .....**109**
- Slika 4.12.** Zavisnosti pH vrednosti i maksimalnog intenziteta apsorbanace 1 mM Ag/alginatnog koloidnog sa 0,1 mg/ml askorbinske kiseline od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 9 merenja) .....**110**
- Slika 4.13.** Zavisnosti pH vrednosti i maksimalnog intenziteta apsorbanace 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 20 mas.% meda od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 9 merenja) .....**111**
- Slika 4.14.** Zavisnosti pH vrednosti i intenziteta maksimalne apsorbanace 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 40 mas.% meda od vremena (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 9 merenja) .....**112**
- Slika 4.15.** Zavisnost maksimalnog intenziteta apsorbanace od vremena za 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor, 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 0,1 mg/ml askorbinske kiseline, 1 mM Ag/alginatni koloidni rastvor sa 20 i sa 40 mas.% meda (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost 9 merenja).....**113**

- Slika 4.16.** Apsorpcioni spektri tri nezavisno sintetisana 1 mM Ag/alginatna koloidna rastvora sa askorbinskom kiselinom (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji).....**114**
- Slika 4.17.** Apsorpcioni spektri Ag/alginatnog koloidnog rastvora koncentracija nanočestica srebra 2,6 mM i alginata 1,26 mas.% i PVA/Ag/alginatnog koloidnog rastvora koncentracija PVA 5,6 mas.%, nanočestica srebra 2,6 mM i alginata 1,26 mas.% (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 8\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji).....**115**
- Slika 4.18.** Optička mikrografija Ag/alginatnih mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ ) .....**116**
- Slika 4.19.** Intenzitet maksimalne apsorbance Ag/alginatnog koloidnog rastvora pre (isprekidana linija) i nakon ekstruzije (simboli) u zavisnosti od primenjenog elektrostatičkog napona (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja).....**117**
- Slika 4.20.** Apsorpcioni spektri 3,9 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora i Ag/alginatnih mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom datog rastvora (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 10\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji) .....**118**
- Slika 4.21.** Koncentracija srebra u mikročesticama,  $C_m$ , kao funkcija nominalne koncentracije srebra u odgovarajućim početnom Ag/alginatnim koloidnim rastvorima,  $C_{Ag}$  (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 4 merenja).....**119**
- Slika 4.22.** Zavisnost prečnika Ag/alginatnih čestica od primenjenog elektrostatičkog napona (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 20 merenja).....**120**

<b>Slika 4.23.</b> Zavisnost prečnika mikročestica od protoka Ag/alginatnog koloidnog rastvora tokom elektrostatičke ekstruzije (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 20 merenja).....	<b>121</b>
<b>Slika 4.24.</b> FE-SEM mikrofotografije poprečnih preseka vlažnih (A) i suvih (B) Ag/alginatnih mikročestica; bele strelice označavaju individualne nanočestice srebra, dok crvene pokazuju agregate nanočestica (razmernik: 500 nm).....	<b>122</b>
<b>Slika 4.25.</b> Apsorpcioni spektri početnih vlažnih i osušenih Ag/alginatnih mikročestica nakon rastvaranja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 10\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji).....	<b>123</b>
<b>Slika 4.26.</b> Rehidracija suvih Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru: A) reprezentativna vlažna mikročestica; B) suve mikročestice; C) reprezentativna suva mikročestica nakon 24 h rehidracije; D) reprezentativna suva mikročestica nakon 5 dana rehidracije (razmernik: 500 $\mu\text{m}$ ) .....	<b>124</b>
<b>Slika 4.27.</b> Rehidracija suvih Ag/alginatnih mikročestica u destilovanoj vodi: A) vlažne mikročestice; B) suve mikročestice; C) suve mikročestice nakon 48 h rehidracije (razmernik: 500 $\mu\text{m}$ ) .....	<b>124</b>
<b>Slika 4.28.</b> Apsorpcioni spektri vlažnih i rehidratiranih Ag/alginatnih mikročestica u destilovanoj vodi u toku 48 h nakon rastvaranja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 19\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) .....	<b>125</b>
<b>Slika 4.29.</b> Ag/alginatne čestice sa medom dobijene elektrostatičkom ekstruzijom 1 mM Ag/alginatnog koloidnog rastvora sa 10 mas.% meda: A) vlažne čestice; B) suve čestice (razmernik: 500 $\mu\text{m}$ ) .....	<b>126</b>

- Slika 4.30.** Apsorpcioni spektri 1 mM Ag/alginatnog kolidnog rastvora sa 10 mas.% meda i čestica dobijenih ekstruzijom 1 mM Ag/alginatnog kolidnog rastvora sa 10 % meda nakon rastvaranja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20$  %) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji).....**126**
- Slika 4.31.** Nanokompozitne PVA/Ag/alginatne (A, B) i kontrolne Ag/alginatne mikročestice (C, D) pre (A,C) i posle četiri ciklusa zamrzavanja–odmrzavanja (B, D) (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ ) .....**127**
- Slika 4.32.** PVA/Ag/alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom pre zamrzavanja pri rastojanju između elektroda od 8 cm i pri naponu od: A) 7 kV; B) 8 kV (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ ) .....**128**
- Slika 4.33.** Apsorpcioni spektri PVA/Ag/alginatnog koloidnog rastvora i PVA/Ag/alginatnih čestica nakon rastvaranja u Na-citratu u toku 1 h i 24 h (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20$  %) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji).....**129**
- Slika 4.34.** Ag/alginatna mikrovlakna u prvoj eksperimentalnoj seriji: A) vlažna; B) suva (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ ) .....**130**
- Slika 4.35.** Apsorpcioni spektri vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana u prvoj eksperimentalnoj seriji (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20$  %) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji)....**131**
- Slika 4.36.** Ag/alginatna mikrovlakana dobijena u drugoj eksperimentalnoj seriji: A) vlažna; B) suva (razmernik: 500  $\mu\text{m}$ ) .....**131**
- Slika 4.37.** Apsorpcioni spektri vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana u drugoj eksperimentalnoj seriji (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20$  %) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji).....**133**



<b>Slika 4.38.</b> Ag/alginatna mikrovlakna sa medom dobijena u prvoj eksperimentalnoj seriji: A) vlažna mikrovlakna; B) suva mikrovlakna (razmernik: 500 $\mu\text{m}$ ).....	<b>134</b>
<b>Slika 4.39.</b> Apsorpcioni spektri vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom u prvoj eksperimentalnoj seriji (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektri bili uočljiviji) .....	<b>135</b>
<b>Slika 4.40.</b> Ag/alginatna mikrovlakna sa medom dobijena u drugoj eksperimentalnoj seriji: A) vlažna mikrovlakna; B) suva mikrovlakna (razmernik: 500 $\mu\text{m}$ ).....	<b>136</b>
<b>Slika 4.41.</b> Apsorpcioni spektri vlažnih i suvih Ag/alginatnih mikrovlakana sa medom dobijenih u drugoj eksperimentalnoj seriji (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja, standardene devijacije ( $\leq 20\%$ ) su izostavljene kako bi spektari bili uočljiviji) .....	<b>137</b>
<b>Slika 4.42.</b> Eksperimentalno određene vrednosti napona u zavisnosti od primenjene deformacije pri brzini kompresije od 337,5 $\mu\text{m/s}$ u dinamičkom režimu za pakovane slojeve Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica srebra i kontrolne Ca-alginatne mikročestice i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja) .....	<b>139</b>
<b>Slika 4.43.</b> Eksperimentalno određene vrednosti napona u zavisnosti od primenjene deformacije pri stepenastom povećanju deformacije od 50 $\mu\text{m}$ pri brzini kompresije od 337,5 $\mu\text{m/s}$ svakih 30 min za pakovane slojeve Ag/alginatnih i kontrolnih mikročestica i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja).....	<b>141</b>

**Slika 4.44.** Eksperimentalno određene zavisnosti napona od primenjene deformacije za pakovane slojeve PVA/Ag/alginate i kontrolnih alginate čestica pri deformaciji od 10 % brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  i frekvenciji od 0,56 Hz i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja).....**143**

**Slika 4.45.** Eksperimentalno određene zavisnosti napona od primenjene deformacije za pakovane slojeve PVA/Ag/alginate i alginate čestica pri stepenastom povećanju deformacije za 50  $\mu\text{m}$  svakih 30 min i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja).....**144**

**Slika 4.46.** Eksperimentalno određene zavisnosti napona od primenjene deformacije za PVA, PVA/Ag/alginate i PVP/PVA/Ag/alginate diskove pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  u dinamičkom režimu i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja).....**146**

**Slika 4.47.** Eksperimentalno određene zavisnosti napona od primenjene deformacije za PVA/Ag/alginate i PVA diskove pri stepenastom povećanju deformacije za 50  $\mu\text{m}$  svakih 30 min i PVP/PVA/Ag/alginate diskove pri stepenastom povećanju deformacije za 75  $\mu\text{m}$  svakih 30 min i linearne zavisnosti određene metodom najmanjih kvadratnih odstupanja (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost od 3 merenja).....**147**

**Slika 4.48.** Preživljavanje, S, kultura nestimuliranih mononuklearnih ćelija periferne krvi i stimuliranih sa dodatkom fitohemaglutinina u prisustvu Ag/alginate mikročestica dobijenih od Ag/alginate koloidnih rastvora sa različitim koncentracijama nanočestica srebra, C, sa standardnim devijacijama (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja).....**149**

**Slika 4.49.** Mikrofotografije kontrolnih kultura i kultura mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon 72 h tretmana Ag/alginatnim mikročesticama dobijenih od 0,5 mM, 1 mM i 1,5 mM Ag/alginatnih koloidnih rastvora: A) nestimulisane mononuklearne ćelije periferne krvi; B) stimulisane mononuklearne ćelije periferne krvi sa dodatkom fitohemaglutinina.....**150**

**Slika 4.50.** Preživljavanje, *S*, telećih hondrocita u monosloju u odnosu na kontrolu, kultura monosloja ćelija sa dodatkom Ca-alginatnih mikročestica, pri dodatku Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama nanočestica,  $C_8$ , različitih masa po bunaruću: A) 0,3 g; B) 0,6 g (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja).....**151**

**Slika 4.51.** Preživljavanje, *S*, kulture telećih hondrocita u prisustvu alginatnih i Ag/alginatnih mikročestica sa različitim koncentracijama normalizovana u odnosu na kontrolni uzorak sa Ca-alginatnim mikročesticama kao funkcija koncentracije ukupnog oslobođenog srebra u medijum, *C* (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja) .....**153**

**Slika 4.52.** Opekotina II stepena kod mužjaka *Wistar* pacova nakon indukcije.....**158**

**Slika 4.53.** Zavisnost površine opekotine od vremena za kontrolnu grupu (G1), grupu tretiranu komercijalnom kremom (G2) i grupu tretiranu Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3) (eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 3 merenja) .....**160**

**Slika 4.54.** Klinička evaluacija ozdravljenja opekotina drugog stepena kod mužjaka *Wistar* pacova u kontrolnoj grupi (G1), grupi tretiranoj komercijalnom kremom (G2) i grupi tretiranoj Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3): A) termičke lezije 4 dana posle izazivanja opekotine; B) termičke lezije 11 dana posle izazivanja opekotine; C) termičke lezije 21 dan posle indukovanja opekotine.....**161**

**Slika 4.55.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crna strelica pokazuje početak reepitelizacije; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crne strelice označavaju edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C) bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila, crne strelice označavaju retke makrofage, dok crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 200x; D) crne strelice označavaju fibroblaste; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**162**

**Slika 4.56.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom kremom (G2): A) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvena strelica označava novostvoreni krvni sud, dok crna strelica pokazuje početak reepitelizacije; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crne strelice označavaju edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje uveličanje 200x; D) crne strelice označavaju fibroblaste; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**163**

**Slika 4.57.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3): A) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, dok crna strelica pokazuje početak reepitelizacije; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crne strelice označavaju edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C) crne strelice označavaju makrofage; H&E bojenje, uveličanje 200x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, a crvena strelica označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**164**

**Slika 4.58.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crna strelica pokazuje reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 12,5x; B) crne strelice označavaju edem, bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila; H&E bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvena strelica označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, pri čemu plava obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**165**

**Slika 4.59.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom kremom (G2): A) crne strelice pokazuju reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 12,5x; B) crne strelice označavaju edem, bela strelica pokazuje neutrofile, dok crvena označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, bele strelice pokazuju fibroblaste, dok crvena označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**166**

**Slika 4.60.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3): A) crne strelice pokazuju početak reepitelizacije; H&E bojenje, uveličanje 12,5x; B) crne strelice označavaju edem, dok bele strelice pokazuju neutrofile; H&E bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvene strelice označavaju brojne novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) bela strelica pokazuje reepitelizaciju, crne strelice pokazuju fibroblaste, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**167**

**Slika 4.61.** Histopatološki nalaz kože 21 dan nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe G1: A) bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila, crne strelice pokazuju reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvena strelica označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, crvena strelica označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**168**

**Slika 4.62.** Histopatološki nalaz kože 21 dan nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom kremom (G2): A) bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila, crne strelice pokazuju reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvena označava novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, a crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**169**

**Slika 4.63.** Histopatološki nalaz kože 21 dan nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane Ag/alginatnim koloidnim rastvorom (G3): A), crne strelice pokazuju potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju makrofage; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju brojne fibroblaste, dok crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**170**

**Slika 4.64.** Zavisnost površine opekotine od vremena za kontrolnu grupu (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2), grupu tretiranu vlažnim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) i grupu tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G4) (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja) .....173

**Slika 4.65.** Klinička evaluacija ozdravljenja opekotina drugog stepena kod mužjaka *Wistar* pacova u kontrolnoj grupi (G1), grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2), grupi tretiranoj vlažnim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) i grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G4): A) termičke lezije posle 4 dana od izazivanja opekotine; B) termičke lezije posle 11 dana od izazivanja opekotine; C) termičke lezije posle 19 dan od indukovanja opekotine.....174

**Slika 4.66.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2): A) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrata sastavljen od neutrofila, dok crna strelica pokazuje reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) bele strelice označavaju edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, dok crne strelice predstavljaju makrofage; H&E bojenje, uveličanje 400x.....175

**Slika 4.67.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane vlažnim mikrovlaknima (G3): A) bela strelica označava subepidermalni infiltrata od neutrofile, dok crna strelica pokazuje reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) bele strelice označavaju edem, crvena strelica označava novostvoreni krvni sud pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrate sastavljen od neutrofila, dok crne strelice predstavljaju makorfage; H&E bojenje, uveličanje 400x.....175

**Slika 4.68.** Histopatološki nalaz kože 4 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim mikrovlaknima (G4): A) bela strelica označava subepidermalni infiltrata od neutrofile, dok crna strelica pokazuje reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 100x; B) bele strelice označavaju edem, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrata sastavljen od neutrofila, crne strelice predstavljaju makrofage, dok crvena strelica označavaju novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**176**

**Slika 4.69.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crne strelice pokazuju umerenu reepitelizaciju koja obuhvata između 1/3 i 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice označavaju makrofage, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) bela strelica označava subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, dok crne strelice pokazuju edem; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**177**

**Slika 4.70.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2): A) uzorak sa izraženom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) uzorak sa umerenom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata između 1/3 i 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; C) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice označavaju makrofage, dok bela strelica pokazuje reepitelizaciju pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove, dok crne strelice pokazuju edem; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**178**



**Slika 4.71.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane vlažnim mikrovlaknima (G3): A) uzorak sa izraženom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) uzorak sa umerenom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju reepitelizaciju koja obuhvata između 1/3 i 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; C) crne strelice označavaju makrofage, bele strelice označavaju fibroblaste, dok crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) bele strelice označavaju subepidermalni infiltrat od neutrofila, crvena strelica reepitelizaciju, dok crna strelica pokazuje edem; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**179**

**Slika 4.72.** Histopatološki nalaz kože 11 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim mikrovlaknima (G4): A) uzorak sa izraženom reepitelizacijom: crne strelica pokazuje reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) uzorak sa umerenom reepitelizacijom: crne strelica pokazuje reepitelizaciju koja obuhvata između 1/3 i 2/3 površine opekotine; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; C) crne strelice označavaju makrofage, bele strelice označavaju fibroblaste, dok crvena strelica pokazuje edem pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; C) bele strelice označavaju neutrofile, crvene strelice pokazuju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**180**

**Slika 4.73.** Histopatološki nalaz kože 19 dana nakon indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) uzorak sa potpunom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) uzorak sa izraženom reepitelizacijom: crne strelice pokazuju izraženu reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine, bela strelica pokazuje subepidermalni infiltrat od neutrofila; H&E bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, crvena strelica novostvoreni krvni sud pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**182**

**Slika 4.74.** Histopatološki nalaz kože 19 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2): A) crne strelice pokazuju potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crne strelice označavaju makrofage, bele strelice retke neutrofile u subepidermalnoj regiji; H&E bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice novostvorene krvne sud pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**183**

**Slika 4.75.** Histopatološki nalaz kože 19 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane vlažnim mikrovlaknima (G3): A) uzorak sa potpunom reepitelizacijom: crne strelice pokazuje potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) uzorak sa izraženom reepitelizacijom: crna strelica pokazuje izraženu reepitelizaciju koja obuhvata više od 2/3 površine opekotine, bela strelica pokazuje subepidermalni infiltrat od neutrofila; H&E bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju makrofage, dok crvene strelice pokazuju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x; D) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**184**

**Slika 4.76.** Histopatološki nalaz kože 19 dana nakon indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim mikrovlaknima (G4): A) crne strelice pokazuju potpunu reepitelizaciju; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crne strelice označavaju makrofage, crvene strelice pokazuju novostvorene krvne sudove; H&E bojenje, uveličanje 400x; C) crne strelice označavaju fibroblaste, crvene strelice označavaju novostvorene krvne sudove pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**185**

**Slika 4.77.** Zavisnost površine opekotine II stepena od vremena za kontrolnu grupu (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupu tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) (eksperimentalno dobijeni podaci su srednja vrednost najmanje 4 merenja).....**188**

**Slika 4.78.** Klinička evaluacija ozdravljenja opekotina drugog stepena kod mužjaka *Mus musculus* miševa u kontrolnoj grupi (G1), grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2), i grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3): A) termičke lezije 10 dana nakon izazivanja opekotine; B) termičke lezije 21 dan nakon izazivanja opekotine.....**189**

**Slika 4.79.** Zavisnost stepena eritema od vremena za kontrolnu grupu (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupu tretiranu Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) (eksperimentalno dobijeni podaci su srednja vrednost najmanje 4 merenja) .....**190**

**Slika 4.80.** Histopatološki nalaz kože nakon 10 dana od indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crvena strelica označava krustu, zelena strelica označava prvi sloj inflamatornog infiltrata od neutrofila, dok crna strelica označava drugi sloj inflamatornog infiltrata od limfocita, neutrofila i makrofaga; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crna strelica označava granulaciono tkivo, dok crvena strelica označava skeletna mišićna vlakna u regeneraciji; H&E bojenje, uveličanje 100x; C) crvene strelice označavaju regeneraciju skeletnih mišićnih vlakana; H&E bojenje, uveličanje 200x.....**191**

**Slika 4.81.** Histopatološki nalaz kože nakon 10 dana od indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2): A) crvena strelica označava krustu, zelena strelica označava prvi sloj inflamatornog infiltrata od neutrofila, dok crna strelica označava drugi sloj inflamatornog infiltrata od limfocita, neutrofila i makrofaga; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crna strelica označava granulaciono tkivo, dok crvena strelica označava skeletna mišićna vlakna u regeneraciji; H&E bojenje, uveličanje 100x; C) crvene strelice označavaju regeneraciju skeletnih mišićnih vlakana; H&E bojenje, uveličanje 200x.....**191**

**Slika 4.82.** Histopatološki nalaz kože nakon 10 dana od indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3): A) crvena strelica označava krustu, zelena strelica označava prvi sloj inflamatornog infiltrata od neutrofila, dok crna strelica označava drugi sloj inflamatornog infiltrata od limfocita, neutrofila i makrofaga; H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crna strelica označava granulaciono tkivo, dok crvena strelica označava skeletna mišićna vlakna u regeneraciji; H&E bojenje, uveličanje 100x; C) crvene strelice označavaju regeneraciju skeletnih mišićnih vlakana; H&E bojenje, uveličanje 200x .....**192**

**Slika 4.83.** Histopatološki nalaz kože nakon 21 dana od indukcije opekotine kod kontrolne grupe (G1): A) crne strelice označavaju kožu oko mesta povrede sa folikulima dlaka (crvene strelice); H&E bojenje, uveličanje 40x; B) ožiljak na mestima prethodno nanete povrede, crne strelice označavaju potpunu reepitelizaciju, crvena strelica pokazuje gusto vezivno tkivo dermisa pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju inflamatorne ćelije u dermisu; H&E bojenje, uveličanje 100x; D) crvene strelice označavaju skeletna mišićna vlakna u procesu regeneracije, crna strelica označava intaktna skeletna mišićna vlakna; H&E bojenje, uveličanje 200x.....**193**

**Slika 4.84.** Histopatološki nalaz kože nakon 21 dana od indukcije opekotine kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2): A) žuta strelica označava ožiljka na mestima prethodno nanete povrede, crne strelice označavaju kožu oko mesta povrede sa folikulima dlaka (crvene strelice); H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crne strelice označavaju potpunu reepitelizaciju, žuta strelica pokazuje gusto vezivno tkivo dermisa, crvena strelica označava sloj skeletnih mišićnih vlakana, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju inflamatorne ćelije u dermisu; H&E bojenje, uveličanje 100x; D) crvena strelica označava skeletna mišićna vlakna u procesu regeneracije; H&E bojenje, uveličanje 200x.....**194**

**Slika 4.85.** Histopatološki nalaz kože nakon 10 dana od indukcije opekotine kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3): A) žute strelice označavaju ožiljka na mestima prethodno nanete povrede, crne strelice označavaju kožu oko mesta povrede sa folikulima dlaka (crvene strelice); H&E bojenje, uveličanje 40x; B) crne strelice označavaju potpunu reepitelizaciju, žuta strelica pokazuje gusto vezivno tkivo dermisa, crvene strelice označavaju potpuno formiran i diferenciran mišićni sloj, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) crne strelice označavaju inflamatorne ćelije u dermisu, crvena strelica označava potpuno formiran i diferenciran mišićni sloj; H&E bojenje, uveličanje 100x.....**195**

**Slika 4.86.** Zavisnost površine hronične rane od vremena za kontrolnu grupu 1 i kontrolnu grupu 2 (eksperimentalno dobijeni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja).....**196**

**Slika 4.87.** Zavisnost površine hronične rane od vremena za kontrolnu grupu 1 (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskom srebrom (G2) i grupu tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) (eksperimentalno dobijeni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja).....**198**

**Slika 4.88.** Klinička evaluacija ozdravljenja hronične rane kod mužjaka *Wistar* pacova u kontrolnoj grupi 1 (G1), grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3): A) hronična lezija nakon 14 dana tretmana; B) hronična lezije nakon 28 dana tretmana.....**199**

**Slika 4.89.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 14 dana nakon početka tretmana hronične rane kod kontrolne grupe 1 (G1): A) bele strelice označavaju ranu; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) bela strelica označava ranu, crna strelica označava novostvoreni epitel, dok crvena strelica pokazuje granulaciono tkivo koje popunjava defekt; H&E bojenje, uveličanje 40x; C) bela strelica označava ranu koju od dna popunjava granulaciono tkivo sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvena strelica) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; D) bela strelica označava ranu, crne strelice označavaju neutrofile, dok crvena pokazuje novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**200**

**Slika 4.90.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 14 dana nakon početka tretmana hronične rane grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskom srebrom (G2): A) bela strelica označava ranu, Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) bela strelica označava ranu, crna strelica označava novostvoreni epitel, H&E bojenje, uveličanje 40x; C) bela strelica označava dno rane koje popunjava granulaciono tkivo sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvene strelice) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; D) bela strelica označava dno rane, crne strelice pokazuju neutrofile, dok crvena pokazuje novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**201**

**Slika 4.91.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 14 dana nakon početka tretmana hronične rane kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3): A) bele strelice označavaju ranu, dok crvena strelica pokazuje granulaciono tkivo; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) bela strelica označava ranu, crne strelica označava novostvoreni epitel; H&E bojenje, uveličanje 40x; C) granulaciono tkivo sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvene strelice) i kolagenih vlakana (plavo obojenje), Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) bela strelica označava ranu, crne strelice neutrofile, dok crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**203**

**Slika 4.92.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane kod dve životinje iz kontrolne grupe 1 (G1) sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crne strelice), crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, a žute strelice označavaju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje ukazuje na prisustvo kolagenih vlakana; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x; C, D) delimično reepitelizovana rana gde bela strelica označava ranu, crna strelica pokazuje novostvoreni epitel, narandžasta strelica pokazuje neutrofile u rani, crvene strelice novostvorene krvne sudove, a žute strelice označavaju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje ukazuje na prisustvo kolagenih vlakana; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x.....**204**

**Slika 4.93.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) kod 2 životinje sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija (crne strelice) gde crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, žute strelice pokazuju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x; C, D) rana (bele strelice) gde crne strelice označavaju delimičnu reepitelizaciju, crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, žute strelice pokazuju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x.....**205**

**Slika 4.94.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) kod 3 životinje sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crna strelica) gde crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, žute strelice označavaju neutrofile u dermu, pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x; C, D) bele strelice označavaju ranu, dok crne strelice pokazuju delimičnu reepitelizaciju, crvena strelica pokazuje novostvoreni krvni sud, žute strelice označavaju neutrofile u dermu pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x, odnosno 400x.....**206**

**Slika 4.95.** Zavisnost površine hronične rane od vremena za kontrolnu grupu 2 (G1), grupu tretiranu komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupu tretiranu suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) (eksperimentalno dobijeni podaci su srednja vrednost najmanje 3 merenja).....**209**

**Slika 4.96.** Zavisnost površine hronične rane od vremena za jednu životinju iz grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i jednu životinju iz grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3).....**210**



**Slika 4.97.** Klinička evaluacija ozdravljenja hroničnih rana kod mužjaka *Wistar* pacova u kontrolnoj grupi 2 (G1), grupi tretiranoj komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i grupi tretiranoj suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3): A) hronične lezije nakon 14 dana tretmana; B) hronične lezije nakon 28 dana tretmana; primeri rana u grupama G2 i G3 gde je došlo do zarastanja.....**211**

**Slika 4.98.** Klinička evaluacija ozdravljenja hroničnih rana kod mužjaka *Wistar* pacova kod kojih nije došlo do ozdravljenja nakon 28 dana tretmana rana komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) .....**212**

**Slika 4.99.** Histopatološki nalaz uzoraka kože nakon 14 dana tretmana hronične lezije kontrolne grupe 2 (G1): A) crne strelice označavaju reepitelizaciju, dok bela strelica pokazuje ranu; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) crna strelica označava reepitelizaciju, bele strelice pokazuju ranu, dok crvene strelice pokazuju granulaciono tkivo; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) rana (bela strelica) koju počev od ivica i dna popunjava granulaciono tkivo, sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvena strelica) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) bela strelica označava dno rane, žute strelice neutrofile, crvena strelica novostvoreni krvni sud, dok crne pokazuju edem; H&E bojenje, uveličanje 400x.....**213**

**Slika 4.100.** Histopatološki nalaz uzoraka kože nakon 14 dana tretmana hronične lezije kod grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2): A) bela strelica označava ranu, crna strelica pokazuje reepitelizaciju; Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) bela strelica označava ranu, crna strelica pokazuje reepitelizaciju, dok crvena strelica pokazuje granulaciono tkivo; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) granulaciono tkivo, sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvene strelice) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) crna strelica označava reepitelizaciju, a žute strelice neutrofile, H&E bojenje, uveličanje 400x.....**214**

**Slika 4.101.** Histopatološki nalaz uzoraka kože nakon 14 dana tretmana hronične lezije kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3): A) crne strelice označavaju reepitelizaciju, bela strelica označava ranu, Mason trihrom bojenje, uveličanje 12,5x; B) crna strelica označava reepitelizaciju, bela strelica označava ranu, dok crvena strelica pokazuje granulaciono tkivo; Mason trihrom bojenje, uveličanje 40x; C) granulaciono tkivo, sastavljeno od fibroblasta (crne strelice), novostvorenih krvnih sudova (crvena strelica) i kolagenih vlakana (plavo obojenje); Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x; D) crna strelica označava reepitelizaciju, crvene stelice označavaju edem, dok žute strelice pokazuje neutrofile, H&E bojenje, uveličanje 400x.....**215**

**Slika 4.102.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane kod kontrolne grupe 2 (G1) kod životinja sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crne strelice), pri čemu plavo obojenje (B) ukazuje na prisustvo kolagenih vlakana; H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C, D) delimično reepitelizovana rana, gde bela strelica označava ranu, crna strelica pokazuje novostvoreni epitel sa granulacionim tkivom, koje čine fibroblasti (žute strelice), novostvoreni krvni sudovi (crvene strelice) i kolagena vlakna (plavo obijenje, slika D); H&E bojenje, uveličanje 100x, odnosno Masonovo trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**217**

**Slika 4.103.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane grupe tretirane komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) kod životinja sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crne strelice), pri čemu plavo obojenje predstavlja kolagena vlakna; H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Masonovo trihrom bojenje, uveličanje 200x; C, D) rana (bele strelice) sa delimičnom reepitelizacijom (crna strelica) i granulacionim tkivom, koga čine fibroblasti (žute strelice), novostvoreni krvni sudovi (crvene strelice) i kolagena vlakana (plavo obojenje, na slici D); H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**218**

**Slika 4.104.** Histopatološki nalaz uzoraka kože 28 dana nakon početka tretmana hronične rane kod grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3) kod životinja sa različitim stepenom reepitelizacije: A, B) potpuna reepitelizacija rane (crna strelica) pri čemu plavo obojenje (B) predstavlja kolagena vlakna; H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 200x; C, D) bele strelice označavaju ranu, crna strelica delimičnu reepitelizaciju, dok granulaciono tkivo čine fibroblasti (žute strelice), novostvoreni krvni sudovi (crvene strelice) i kolagena vlakna (plavo obojenje na slici D); H&E bojenje, uveličanje 40x, odnosno Mason trihrom bojenje, uveličanje 400x.....**219**

## 7.2. SPISAK TABELA

<b>Tabela 4.1.</b> Veličina Ag/alginatnih mikročestica dobijenih iz koloidnih rastvora alginata sa različitim koncentracijama nanočestica srebra.....	<b>138</b>
<b>Tabela 4.2.</b> Vrednosti dinamičkog modula elastičnosti pakovanih slojeva ispitivanih Ag/alginatnih mikročestica pri brzini kompresije od 337,5 $\mu\text{m/s}$ i deformaciji od 10 %.....	<b>139</b>
<b>Tabela 4.3.</b> Vrednosti ravnotežnih modula elastičnosti pakovanih slojeva ispitivanih Ag/alginatnih i kontrolnih mikročestica pri stepenastom povećanju deformacije od 50 $\mu\text{m}$ pri brzini kompresije od 337,5 $\mu\text{m/s}$ do deformacije od 10 % svakih 30 min.....	<b>141</b>
<b>Tabela 4.4.</b> Otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih mikročestica u fiziološkom rastvoru nakon 48 h.....	<b>152</b>
<b>Tabela 4.5.</b> Broj kolonija <i>Staphylococcus aureus</i> TL u kontrolnoj suspenziji i suspenzijama sa vlažnim, odnosno suvim Ag/alginatnim mikročesticama u koncentraciji od 0,4 g/ml računato na vlažnu masu mikročestica.....	<b>156</b>
<b>Tabela 4.6.</b> Broj kolonija <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 u kontrolnoj suspenziji i suspenziji sa vlažnim i suvim Ag/alginatnim mikročesticama u koncentraciji 0,4 g/ml računato na vlažnu masu mikročestica.....	<b>157</b>
<b>Tabela 4.7.</b> Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize tkiva kože opečenih netretiranih životinja (G1), tretiranih komercijalnom kremom (G2) i tretiranih Ag/alginatnim koloidnim rastvorom sa askorbinskom kiselinom (G3).....	<b>171</b>

**Tabela 4.8.** Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize uzoraka tkiva kože opečenih netretiranih životinja (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2), tretiranih vlažnim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G4).....**186**

**Tabela 4.9.** Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože nakon 14 dana od početka tretmana hronične lezije netretiranih životinja kontrole 1 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3).....**203**

**Tabela 4.10.** Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože potpuno reepitelizovanih rana nakon 28 dana od početka tretmana hronične lezije netretiranih životinja u kontroli 1 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima (G3) .....**207**

**Tabela 4.11.** Sumarni prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože delimično reepitelizovanih rana nakon 28 dana od početka tretmana hronične lezije netretiranih životinja u kontroli 1 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa jonskim srebrom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima(G3).....**207**

**Tabela 4.12.** Sumirani prikaz rezultata histopatološke analize isečaka kože nakon 14 dana od indukcije hronične lezije netretiranih životinja u kontroli 2 (G1), životinja tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3).....**216**

**Tabela 4.13.** Sumirani prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože, potpuno reepitelizovanih rana, nakon 28 dana od indukcije hronične lezije netretiranih životinja u kontroli 2 (G1), tretiranih komercijalnom Ca-alginatnom oblogom sa medom (G2) i tretiranih suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3).....**220**

**Tabela 4.14.** Sumirani prikaz rezultata histopatološke analize isečaka tkiva kože, delimično reepitelizovanih rana, nakon 28 dana od indukcije hronične lezije kod po jedne životinje iz kontrolne grupe 2 (G1), grupe tretirane komercijalnom oblogom (G2) i grupe tretirane suvim Ag/alginatnim mikrovlaknima sa medom (G3).....**221**

## 8. LITERATURA

1. Acar A., Uygur F., Diktas H., Evinc R., Ulku E., Oncul O., Gorenek L. (2011) Comparison of silver-coated dressing (Acticoat®), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass®) and nystatin for topical antifungal effect in *Candida albicans*-contaminated, full-skin-thickness rat burn wounds. *Burns* 3,7: 882–5.
2. Adams M. A., Roughley P. J. (2006) What is intervertebral disc degeneration and what causes it. *Spine* 31(18): 2151-61.
3. Agabekov V., Ivanova N., Dlugunovich V., Vostchula I. (2012) Optical properties of polyvinyl alcohol films modified with silver nanoparticles. *Journal of Nanomaterials* 2012:1-5.
4. Agarwal A., Weis T. L., Schurr M. J., Faith N. G., Czuprynski C. J., McAnulty J. F., Murphy C. J., Abbott N. L. (2010) Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells. *Biomaterials* 31:680–90.
5. Ai L., Yue H., Jiang J. (2012) Environmentally friendly light-driven synthesis of Ag nanoparticles *in situ* grown on magnetically separable biohydrogels as highly active and recyclable catalysts for 4-nitrophenol reduction. *Journal of Materials Chemistry* 22: 23447-53.
6. Angelescu D. G., Vasilescu M., Somoghi R., Donescu D, Teodorescu V. S. (2010) Kinetics and optical properties of the silver nanoparticles in aqueous L64 block copolymer solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 366: 155–62.
7. Anilkumar A. V., Lacik I., Wang T. G. (2001) A novel reactor for making uniform capsules. *Biotechnology and Bioengineering* 75: 581–9.
8. Armentano I., Dottori M., Fortunati E., Mattioli S., Kenny J. M. (2010) Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer Degradation and Stability* 95: 2126–46.
9. Ateshian G. A, Hung C. T. (2003) Functional properties of native articular cartilage. In: *Functional Tissue engineering: The role of biomechanics*. Guilak F., Butler D. L, Goldstein S. A., Mooney D. J (eds), Springer – Verlag NY Inc., NY, USA, 46-68.

10. Augst A. D., Kong H. J., Mooney D. J. (2006) Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience* 6(8): 623-33.
11. Aureli P., Franciosa G., Fenicia L. (2002) Infant botulism and honey in Europe: a commentary. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 21(9): 866-8.
12. Bacheva A. V., Plieva F. M., Izsogorskaza E. N., Filippova I. Z., Lozinsky V. I. (2001) Peptide synthesis in organic media with subtilisin 72 immobilized on poly(vinyl alcohol)-cryogel carrier. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11: 1005-8.
13. Bader R. A., Rochefort W. E. (2008) Rheological characterization of photopolymerized poly(vinyl alcohol) hydrogels for potential use in nucleus pulposus replacement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 86: 494–501.
14. Bajpai S. K., Sharma S. (2004) Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *Reactive & Functional Polymers* 59: 129–40.
15. Bajpai A. K., Shukla S. K., Bhanu S., Kankane S. (2008) Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* 33: 1088-18.
16. Baker M., Walsh S., Schwartz Z., Boyan B. (2012) A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100B(5): 1451–57.
17. Bao Q. B., McCullen G., Higham P., Dumbleton J., Yuan H. (1996) The artificial disc: theory, design and materials. *Biomaterials* 17: 1157-67
18. Bao Q. B., Yuan H. A. (2000) Artificial disc technology. *Neurosurg Focus*, 9 (4):1-7.
19. Barmapalexis P., Koutsidis I., Karavas E., Louka D., Papadimitriou S. A., Bikiaris D. N. (2013). Development of PVP/PEG mixtures as appropriate carriers for the preparation of drug solid dispersions by melt mixing technique and optimization of dissolution using artificial neural networks. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85: 1219–31.



20. Barui A., Mandal N., Majumder S., Das R. K., Sengupta S., Banerjee P., Ray A. K., RoyChaudhuri C., Chatterjee J. (2013) Assessment of molecular events during in vitro re-epithelialization under honey-alginate matrix ambience. *Materials Science and Engineering C* 33: 3418–25.
21. Basualdo C., Sgroy V., Finola M. S., Marioli J. M. (2007) Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology* 124: 375-81.
22. Beanes S., Dang C., Soo C., Ting K. (2003) Skin repair and scar formation: the central role of TGF- $\beta$ . *Expert Reviews in Molecular Medicine* 5: 1-11.
23. Benamer S., Mahlous M., Boukrif A., Mansouri B., Larbi Youef S. (2006) Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly(vinyl pyrrolidone). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* 248: 284–90.
24. Berry C. C., Wells S., Charles S., Curtis A. S. G. (2003). Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 24: 4551-7.
25. Bhainsa K. C., D'Souza S. F. (2006) Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigates*. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 47: 160-4.
26. Bharali D. J., Sahoo S. K., Mozumdar S., Maitra A. (2003) Cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles: a potential carrier for hydrophilic drugs. *Journal of Colloid and Interface Science* 258: 415–23.
27. Bhattacharya R., Mukherjee P. (2008) Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 1289–306.
28. Boateng J., Matthews K., Stevens H., Eccleston G. (2008) Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of pharmaceutical sciences* 97(8): 2892-923.
29. Bonakdar S. Emami S. H., Shokrgozar M. A., Farhadi A., Ahmadi S. A. H, Amanzadeh A. (2010) Preparation and characterization of polyvinyl alcohol hydrogels crosslinked by biodegradable polyurethane for tissue engineering of cartilage. *Materials Science and Engineering C* 30: 636–43.

30. Bryant S., Davis-Arehart K., Luo N., Shoemaker R., Arthur A., Anseth K. (2004) Synthesis and Characterization of Photopolymerized Multifunctional Hydrogels: Water-Soluble Poly(Vinyl Alcohol) and Chondroitin Sulfate Macromers for Chondrocyte Encapsulation. *Macromolecules* 37 (18): 6726–33.
31. Buckwalter J. A., Mankin H. J. (1997) Instructional Cours Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons – Articular cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte- Matrix Interactions. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am)* 79: 600-11.
32. Bučko M., Vikartovska A., Lacik I., Kollarikova G., Gemeiner P. (2005) Patoprsty V., Brygin M., Immobilization of a whole-cell epoxide-hydrolyzing biocatalyst in sodium alginate-cellulose sulfate-poly(methylene-co-guanidine) capsules using a controlled encapsulation process. *Enzyme and Microbial Technology* 36(1): 118–26.
33. Bugarski B., Smith J., Wu J., Goosen M. F. A. (1993) Methods for animal cell immobilization using electrostatic droplet generation. *Biotechnology Techniques* 7:677-83.
34. Bugarski B., Amsden B., Neufeld R., Poncelot D., Goosen M. F. A. (1994a) Effect electrode geometry and charge on the production of polymer by electrostatics. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 72:517-22.
35. Bugarski B., Li Q., Goosen M. F. A., Poncelot D., Neufeld R., Vunjak-Novakovic G. (1994b) Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation. *AIChE Journal* 40:1026-32.
36. Bugarski B. M., Obradovic B., Nedovic V. A., Poncelot, D. (2004) In: *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*. Nedovic V., Willaert R.G (eds.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 277–94.
37. Bugarski B., Obradovic B., Nedovic V. A., Goosen M. F. A. (2006) In *:Finely dispersed particles: Micro-, Nano-, and Atto- Engineering*. Hsu J. P., Spasic A. (eds.), CRC Press, Boca Raton, USA, 869.
38. Caló, E. and Khutoryanskiy, V. V. (2015) Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65: 252-67.

39. Caswell K. K., Bender C. M., Murphy C. J. (2003) Seedless, surfactantless wet chemical synthesis of silver nanowires. *Nano Letters* 3: 667-9.
40. Chairam S., Somsook E. (2008). Starch vermicelli template for synthesis of magnetic iron oxide nanoclusters. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 320(15): 2039-43.
41. Chairam S., Poolperm C., Somsook E. (2009) Starch vermicelli template-assisted synthesis of size/shape-controlled nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 75: 694-704.
42. Chaki N. K., Sharma J., Mandle A. B., Mulla I. S., Pasricha R., Vijayamohan K. (2004) Size dependent redox behavior of monolayer protected silver nanoparticles (2-7 nm) in aqueous medium. *Physical Chemistry Chemical Physics* 6: 1304-9.
43. Chen D. H., Huang Y. W. (2002) Spontaneous Formation of Ag Nanoparticles in Dimethylacetamide Solution of Poly(ethylene glycol). *Journal of Colloid Interface Science* 255: 299-302.
44. Choi D. H., Park C. H., Kim I. H., Chun H. J., Park K., Han D. K. (2010) Fabrication of core-shell microcapsules using PLGA and alginate for dual growth factor delivery system. *Journal of Controlled Release* 147(2): 193-201.
45. Chraska T., Hostomsky J., Klementova M., Dubsky J. (2009) Crystallization kinetics of amorphous alumina-zirconia-silica ceramics. *The Journal of the European Ceramic Society* 29: 3159-65.
46. Chubinskaya S., Huch K., Schulze M., Otten L., Aydelotte M. B., Cole A. A. (1998) Human articular chondrocytes cultured in alginate beads maintain their gene expression. *Cells and Materials* 8: 151-60.
47. Clemenson S., David L., Espuche E. (2007) Structure and morphology of nanocomposite films prepared from polyvinyl alcohol and silver nitrate: influence of thermal treatment. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 45: 2657-72.
48. Clemenson S., David L., Espuche E. (2008) Metal nanocomposite films prepared in situ from pva and silver nitrate. study of the nanostructuration proces and morphology as a function of the in situ

- routes. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 46: 2062–71.
49. Cowin S. C., Doty S. B. (2007) Cartilage. In: *Tissue mechanics*. Springer Science+Business Media, New York, 471-505.
  50. Cozzoli P. D., Comparelli R., Fanizza E., Curri M. L., Agostiano A., Laub D. (2004) Photocatalytic synthesis of silver nanoparticles stabilized by tio2 nanorods: a semiconductor/metal nanocomposite in homogeneous nonpolar solution. *Journal of the American Chemical Society*. 126(12): 3868-79.
  51. Dai Y., Niu J., Liu J., Yin L., Xu J. (2010) In situ encapsulation of laccase in microfibers by emulsion electrospinning: Preparation, characterization, and application. *Bioresource Technology* 101: 8942–47.
  52. Dale J. J., Callam M. J., Ruckley C. V., Harper D. R., Berrey P. N (1983) Chronic ulcers of the leg: a study of prevalence in a Scottish community. *Health Bulletin (Edinburg)*, 41(6): 310-4.
  53. Darling E., Kyriaco A. (2003) Biomechanical strategies for articular cartilage regeneration. *Annals of Biomedical Engineering*, 31:1114-24.
  54. Darwis D., Stasica P., Razzak M.T., Rosiak J.M. (2002) Characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus. *Radiation Physics and Chemistry* 63: 539-42.
  55. DeMerlis C.C., Schoneker D.R. (2003) Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology* 41(3): 319-26.
  56. De Vos P., Faas M. M., Strand B., Calafiore R. (2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 27: 5603-17.
  57. Demartean O., Jakob M., Schafer D., Heberer M., Martin I. (2003a) Development and validation of a bioreactor for physical stimulation of engineered cartilage. *Biorheology* 40: 331–6.
  58. Demartean O., Wendt D., Braccini A., Jakob M., Schafer D., Heberer M., Martin I. (2003b) Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochemical*

and *Biophysical Research Communications*, 310: 580–8.

59. Dia T., Tegos G., Burkatovskaya M., Castano A., Hamblin M. (2009) Chitosan Acetate Bandage as a Topical Antimicrobial Dressing for Infected Burns. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(2): 393-400.
60. Dijkgraaf L. C., de Bone L. G .M., Boering G., Liem R. S. B. (1995) Normal cartilage structure biochemistry and metabolism. A review of the literature. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 53: 924-9.
61. dos Santos Tavares Pereira D., Madruga Lima-Ribeiro M.H., de Pontes-Filho N.T., dos Anjos Carneiro-Leão A.M., dos Santos Correia M.T. (2012) Development of Animal Model for Studying Deep Second-Degree Thermal Burns. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 1-7.
62. Doublier J. L., Launay B., Cuvelier G. (1992) Viscoelastic properties of food gels. In: *Viscoelastic properties of foods*. Rao M. A., Steffe J. F. (eds), London: Elsevier Applied Science, 371–434.
63. Doyle J., Roth T., Smith R., Li Y. Q., Dunn R. (1997) Effect of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research* 32: 561-8.
64. Drury J. L., Mooney D. J. (2003) Review. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24: 4337-51.
65. Du Toit D. F., Page B. J. (2009) An *in vitro* evaluation of the cell toxicity of honey and silver dressings. *Journal of Wound Care* 18: 383–9.
66. Dubas S. T., Pimpan V. (2008) Optical switch from silver nanocomposite thin films. *Materials Letters* 62: 3361-63.
67. Dubas S. T., Wacharanad S., Potiyaraj P. (2011) Tuning of the antimicrobial activity of surgical sutures coated with silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 380: 25-28.
68. Dunn L., Prosser H., Tan J., Vanags L., Ng M., Bursill C (2013) Murine Model of Wound Healing. *Journal of Visualized Experiments* 75: 50265.

69. Đorđević D. (2010) Biološka karakterizacija biomaterijala. In: *Biomaterijali*. Raković D., Uskoković D. (eds), Beograd, Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, 222-55.
70. Efremenko E. N., Lozinsky V. I., Segeeva V. S., Plieva F. M., Makhlis T. A., Kayankov G. M., Gladilin A. K., Varfolomezev S. D. (2002) Addition of polybrene improves stability of organophosphate hydrolase immobilized in poly(vinil alcohol) cryogel carrier. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 51: 195-201.
71. Eidi H., Joubert O., Attik G., Duval R. E., Bottin M. C., Hamouia A., Maincent P., Rihn B. H. (2010) Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. *International Journal of Pharmaceutics* 396: 1-2, 156-65.
72. El-Sherbiny I. M., Smyth H. D. C. (2010) Biodegradable nano-micro carrier systems for sustained pulmonary drug delivery: (I) Self-assembled nanoparticles encapsulated in respirable/swellable semi-IPN microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 395: 132-41.
73. Engelmayer Jr G. C., Hildebrand D. K., Sutherland F. W. ., Mayer Jr J. E., Sacks M. S. (2003) A novel bioreactor for the dynamic flexural stimulation of tissue engineered heart valve biomaterials. *Biomaterials* 24: 2523-32.
74. Esumi K., Suzuki A., Aihara N., Usui K., Torigoe K. Preparation of Gold Colloids with UV Irradiation Using Dendrimers as Stabilizer. *Langmuir*, 14 (1998) 3157-59.
75. Fambri L., Pegoretti A., Fenner R., Incardona S. D., Migliaresi C. (1997) Biodegradable fibres of poly(l-lactic acid) produced by melt spinning. *Polymer* 38(1): 79-85.
76. Faure C., Derre A., Neri W. (2003) Spontaneous Formation of Silver Nanoparticles in Multilamellar Vesicles. *Journal of Physical Chemistry. B* 107: 4738-46.
77. Fechine G. J. M., Barros J. A. G., Catalani L. H. (2004) Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel production by ultraviolet radiation: new methodologies to accelerate crosslinking. *Polymer* 45: 4705-09.

78. Fenglan X., Yubao L., Xiaoming Y., Hongbing L., Li Z., (2007) Preparation and *in vivo* investigation of artificial cornea made of nano-hydroxyapatite/poly (vinyl alcohol) hydrogel composite. *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18: 635–40.
79. Fletcher J. (2005). Understanding wound dressings: Hydrocolloids. *Nursing Times* 101 (46): 51. <http://www.nursingtimes.net/understanding-wound-dressings-hydrocolloids/203533.article>
80. Forster R. E. J., Thurmer F., Wallrapp C., Lloyd A. W., Macfarlane W., Phillips G. J., Boutrand J.-P., Lewis A. L. (2010) Characterisation of physico-mechanical properties and degradation potential of calcium alginate beads for use in embolisation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (7): 2243-51.
81. Fragonas E., Valente M., Pozzi-Mucelli M., Toffanin R., Rizzo R., Silvestri F., Vittur F. (2000). Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 21: 795-801.
82. Freed L. E., Marquis J. C., Nohria A., Emmanuel J., Mikos A. G., Langer R. (1993). Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 27: 11–23.
83. Freed L. E, Vunjak-Novakovic G. (1995). Culture of cell – polymer tissue constructs in simulated microgravity. *Biotechnology and Bioengineering* 46: 306-13.
84. Freed L. E., Vunjak-Novakovic G. (2000) Tissue engineering bioreactors. In: *Principles of Tissue Engineering*. R. P. Lanza, R. Langer, J. Vacanti (eds), Academic Press, 143-56.
85. French V. M., Cooper R. A., Molan P. C. (2005). The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 228–31.
86. Freshney R. I., Obradovic B., Grayson W., Cannizzaro C., Vunjak-Novakovic G., Principles of tissue culture and bioreactor design. In:

- Principles of Tissue Engineering*. R.P. Lanza, R. Langer and J. Vacanti, (eds), (third edition) Elsevier, Inc, pp. 155-183, 2007.
87. Gamble M. The Hematoxylin and Eosin. In: *Theory and Practice of Histological Techniques*. Bancroft J. D., Gamble M. (eds), Elsevier, 6<sup>th</sup> ed., 121-34.
  88. George J. (2011). PhD thesis: Engineering of Fibrous Scaffolds for use in Regenerative Medicine. Department of materials, Imperial College London
  89. Gethin G. T., Cowman S. (2006) Wound measurement comparing the use of acetate tracings and Visitrak™ digital planimetry. *Journal of Clinical Nursing* 15: 422–7.
  90. Gethin G. T. (2007) The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds UK* 3(3):52-6.
  91. Gethin G. T., Cowman S., Conroy R. M. (2008) The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds. *International Wound Journal* 5: 185–94.
  92. Gibas I., Janik H. (2011) Review: Synthetic Polymer Hydrogels For Biomedical Applications. *Chemistry & Chemical Technology* 4(4): 297-304.
  93. Glicklis R., Shapiro L., Agbaria R., Merchuk J. C., Cohen S. (2000). Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* 67: 344–53.
  94. Gogolewski S., Pennings A. J. (1985) High-modulus fibres of nylon-6 prepared by a dry-spinning method. *Polymer* 26(9): 1394–400.
  95. Golubitskii G. B., Budko E. V., Basova E. M., Kostarnoi A. V., Ivanov V. M (2007) Stability of ascorbic acid in aqueous and aqueous-organic solutions for quantitative determination. *Journal of Analytical Chemistry* 62(8) 742-47.
  96. Gombotz W. R., Wee S. F. (1998) Protein release from alginate matrices. *Advance Drug Delivery Reviews* 31: 267-85.



97. Gong J., Luo L., Yu S.-H., Qian H., Fei L. (2006). Synthesis of copper/cross-linked poly(vinyl alcohol) (PVA) nanocables via simple hydrothermal route. *Journal of Materials Chemistry* 16: 101-5.
98. Granger J., Estrada C. M., Abramo T. J. (2009). An Evidence-Based Approach to Pediatric Burns. *Pediatric Emergency Medicine Practice* 6 (1): 1-22.
99. Grant G. T., Morris E. R., Rees D. A., Smith P. J. C., Thom D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *Febs Letters*, 32: 195-8.
100. Grayson W. L., Bhumiratana S., Cannizzaro C., Chao P. H., Lennon D. P., Caplan A. I., Vunjak-Novakovic G. (2008). Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue engineered bone. *Tissue engineering Part A* 14: 1809-20.
101. Grunder T., Gaissmaier C., Fritz S., Stoop R., Hortschansky P., Mollenhauer J., Aicher W.K. (2004) Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12:559-67.
102. Gupta S. S., Singh O., Bhagel P. S., Moses S., Shukla S., Mathur R. K. (2011) Honey Dressing Versus Silver Sulfadiazene Dressing for Wound Healing in Burn Patients: A Retrospective Study. *Journal of Cutaneous Aesthetic Surgery* 4: 183-7.
103. Guzman M., Dille J., Godet S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8: 37-45.
104. Hall A. C. (1995) Volume sensitive taurine transport in bovine articular chondrocytes. *Journal of Physiology* 484(3): 755-66.
105. Hanna J., Giacomelli J. (1997) A review of wound healing and wound dressing products. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 36(1): 2-14.
106. Hashimoto T., Suzuki Y., Suzuki K., Nakashima T., Tanihara M., Ide C. (2005). Peripheral nerve regeneration using non-tubular alginate gel crosslinked with covalent bonds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16: 503-9.

107. Hashimoto M., Toshima H., Yonezawa T., Kawai K., Iijima M., Endo K. (2014). Evaluation of silver nanoparticle toxicity to RAW264.7 cells in a three-dimensional cell culture. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 4: 51-8.
108. Hasimi A., Stavropoulou A., Papadokostaki K. G., Sanopoulou M. (2008). Transport of water in polyvinyl alcohol films: Effect of thermal treatment and chemical crosslinking. *European Polymer Journal* 44: 4098-107.
109. Hassan C. M. Peppas N. A. (2000). Structure and application of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Advances in Polymer Science* 153: 37-65.
110. Hauselmann H. J., Fernandes R. J., Mok S. S., Schmid T. M., Block J. A., Aydelotte M. B., Kuettner K. E., Thonar J.-M.A. (1994) Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term cultivation in alginate beads. *Journal of Cell Science*, 107:17-27.
111. Heinzen C., Berger A., Marison I, in: V. Nedovic, R. Willaert (Eds.), *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 257-275.
112. Henglein A. (1993) Physicochemical properties of small metal particles in solution: "microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. *Journal of Physical Chemistry* 97: 5457-71.
113. Hong K. H., Park J. L., Sul I. H., Youk J. H., Kang T. J. (2006). Preparation of antimicrobial poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* 44: 2468-74.
114. Horikoshi S., Sorpone N. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications* 1. Introduction to Nanoparticles Published Online: 26 APR 2013 DOI: 10.1002/9783527648122.ch1
115. Hornebecq V., Antonietti M., Cardinal T., Treguer-Delapierre M. (2003) Stable silver nanoparticles immobilized in mesoporous silica. *Chemistry of Materials* 15: 1993-99.

116. Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J. J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro* 19: 975–83.
117. Huwkins D. W. L. (1988) Disc structure and function. In: The biology of the intervertebral disc, Ghosh P. (ed). CRC Press, Boca Raton, FL.
118. Jain P., Pradeep T. (2005). Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and Bioengineering* 90(1): 59-63.
119. Jain J., Arora S., Rajwade J. M., Omay P., Khandelwal S., Paknikar K. M. (2009) Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Molecular Pharmacology* 6(5):1388-401
120. Jiang H., Campbell G., Boughner D., Wan W. K., Quantz M. (2004). Design and manufacture of a polyvinyl alcohol (PVA) cryogel tri-leaflet heart valve prosthesis. *Medical Engineering & Physics* 26: 269–77.
121. Jiang Z. J., Liu C. Y., Sun L.-W. (2005). Catalytic properties of silver nanoparticles supported on silica spheres. *Journal of Physical Chemistry B* 109 (5): 1730-5.
122. Jin W. J., Lee H. K., Jeong E. H., Park W. H., Youk J. H. (2005). Preparation of polymer nanofibers containing silver nanoparticles by using poly(N-vinylpyrrolidone). *Macromol Rapid Commun* 26: 1903–7.
123. Johans C., Clohessy J., Fantini S., Kontturi K., Cunnane V. J. (2002) Electrosynthesis of polyphenylpyrrole coated silver particles at a liquid–liquid interface. *Electrochemistry Communications* 4: 227-30.
124. Jones M. L., Bancroft J. D., Grizzle W. E. (2007) Connective Tissues and Stains. In: *Theory and Practice of Histological Techniques*. Bancroft J. D., Gamble M. Elsevier (6<sup>th</sup> ed): 135-60.
125. Joshi A., Fussell G., Thomas J., Hsuan A., Lowman A., Karduna A., Vresilovic E., Marcolongo M. (2006). Functional compressive mechanics of PVA/PVP nucleus pulposus replacement. *Biomaterials* 27: 176–84.
126. Jovanović S., Jeremić K. (2007) Karakterisanje polimera. TMF; Beograd.

127. Jovanović Ž., Krklješ A., Stojkowska J., Tomić S., Obradović B., Mišković-Stanković, V., Kačarević-Popović Z. (2011) Synthesis and characterization of silver/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposite obtained by in situ radiolytic method. *Radiation Physics and Chemistry* 80: 1208–15.
128. Jovanović Ž., Stojkowska J., Obradović B., Mišković-Stanković V. (2012). Alginate hydrogel microbeads incorporated with Ag nanoparticles obtained by electrochemical method. *Materials Chemistry and Physics* 133: 182–9.
129. Jovanović Ž., Krklješ A., Kačarević-Popović Z., Stojkowska J., Perić-Grujić A., Ristić M., Matić I., Juranić Z., Obradović B., Mišković-Stanković, V. (2013) Bioreactor validation and biocompatibility of Ag/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 105: 230–5.
130. Jovanovic Z., Radosavljevic A., Stojkowska J., Nikolić B., Obradovic B., Kacarevic-Popovic Z., Miskovic-Stankovic V. (2014) Silver/poly(n-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposites obtained by electrochemical synthesis of silver nanoparticles inside the polymer hydrogel aimed for biomedical applications. *Polymer Composites* 35:217–26.
131. Jude E. B., Apelqvist J., Spraul M., Martini J., the Silver Dressing Study Group. (2007) Prospective randomized controlled study of Hydrofiber® dressing containing ionic silver or calcium alginate dressings in non-ischaemic diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine* 24: 280–8.
132. Jull A., Walker N., Parag V., Molan P., Rodgers A. (2008) Honey as adjuvant leg ulcer therapy trial collaborators. Randomized clinical trial of honey-impregnated dressings for venous leg ulcers. *British Journal of Surgery* 95: 175–82.
133. Junter G. A., Vinet F. (2009) Compressive properties of yeast cell-loaded Ca-alginate hydrogel layers: Comparison with alginate–CaCO<sub>3</sub> microparticle composite gel structures. *Chemical Engineering Journal*, 145:514–21.

134. Kamelger F. S., Marksteiner R., Margreiter E., Klima G., Wechselberger G., Hering S., Piza H. (2004) A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model. *Biomaterials* 25: 1649–55.
135. Kaplan H., Guner A. (2000) Characterization and determination of swelling and diffusion characteristics of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels in water. *Journal of Applied Polymer Science* 78: 994-99.
136. Kayal S., Ramanujan, R. V. (2010). Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering C* 30: 484–90.
137. Kawase M., Kurikawa N., Higashiyama Z. S., Miura N., Shiomi T., Ozawa C., Mizoguchi T., Yagi K. (1999) Effectiveness of polyamidoamine dendrimers modified with tripeptide growth factor, glycyl-l-histidyl-l-lysine, for enhancement of function of hepatoma cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(4): 433-7.
138. Keshavartz T., Ramsden G., Phillips P., Mussenden P., Bucke C. (1992). Application of electric field for production of immobilized biocatalysts. *Biotechnology Techniques* 6(5): 445-50.
139. Kesik V., Kurt B., Tunc T., Karslioglu Y., Citak E. K., Kismet E., Koseoglu V. (2010) Melatonin ameliorates doxorubicin-induced skin necrosis in rats. *Annals of Plastic Surgery* 65 (2): 250-3.
140. Khanna P. K., Singh N., Charan S., Subbarao V. V. V. S., Gokhale R., Mulik U. P. (2005) Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method. *Materials Chemistry and Physics* 93: 117–21.
141. Kim K., Young J. L., Won S. L., Seok K. N. (2008). Preparation of high molecular weight atactic poly(vinyl alcohol) hydrogel by electron beam irradiation technique. *Polymer (Korea)*, 32 (6): 587-92.
142. Kim J., der Bruggen B. V. (2010) The use of nanoparticles in polymeric and ceramic membrane structures: Review of manufacturing procedures and performance improvement for water treatment. *Environmental Pollution* 158(7): 2335–49.

143. Kim T. H., Kim M., Park H. S., Shin U. S., Gong M. S., Kim H. W. (2012). Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 100A: 1033–43.
144. Knetsch M. L. W., Koole L. H. (2011) New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers* 3(1): 340-66.
145. Knill C. J., Kennedy J. F., Mistry J., Miraftab M., Smart G., Grocock M. R., Williams H. J. (2004). Alginate fibers modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. *Carbohydrate Polymers* 55: 65–76.
146. Kobayashia M., Chang Y. S., Oka M. (2005) A two year *in vivo* study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials* 26: 3243–48.
147. Kolambkar Y. M., Dupont K. M., Boerckel J. D., Huebsch N., Mooney D. J., Hutmacher D. W., Guldberg R. E. (2011). An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials* 32(1): 65-74.
148. Komarneni S., Li D. S., Newalkar B., Katsuki H., Bhalla A. S. (2002) Microwave-Polyol Process for Pt and Ag Nanoparticles. *Langmuir* 18: 5959-62.
149. Korbut G. S., Mallett A. G., Flashne, Z. A. M., Rajott, R. V. (2004). Improved survival of microencapsulated islets during *in vitro* culture and enhanced metabolic function following transplantation. *Dialectologi* 47: 1810–18.
150. Korchev A. S., Konovalova T., Cammarata V., Kispert L., Slaten L., Mills G. (2006). Radical-Induced Generation of Small Silver Particles in SPEEK/PVA Polymer Films and Solutions: UV-Vis, EPR, and FT-IR Studies. *Langmuir* 22: 375-84.
151. Kuo P. L., Chen W. F. (2003) Formation of silver nanoparticles under structured amino groups in pseudo-dendritic poly (allylamine) derivatives. *Journal of Physical Chemistry B* 107(41): 11267-72.

152. Kwon I. K., Kidoaki S., Matsuda T. (2005) Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* 26(18): 3929-39.
153. Langer R., Vacanti J. P. (1993) Tissue engineering. *Science* 260:920-6.
154. Lee J., Lilly D. G., Doty C. R., Podsiadlo P., Kotov N. A. (2009). *In vitro* toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small* 5, 1213–21.
155. Lee K. Y., Peters M. C., Mooney D. J. (2003). Comparison of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in SCID mice. *Journal of Control Release* 87: 49–56.
156. Leopold N., Lendl B. (2003) A new method for fast preparation of highly surface-enhanced raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *Journal of Physical Chemistry B* 107: 5723-27.
157. LeRoux M. A., Guilak F., Setton L. A. (1999) Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47:46–53.
158. Li W. R., Xie X. B., Shi Q. S., Zeng H. Y., Sheng Y.-, Yang O. U., Chen Y. B. (2010) Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1115–22.
159. Lihui X., Ruimin Z., Gracien E.B., Francis A.O. (2004) Synthesis of silver nano-particles by EB irradiation. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing* 22(2): 69-72.
160. Lin H.-L., Liu W.-H., Shen K.-S., Yu T. L. Cheng C.-H. (2003). Weak gel behaviour of poly(vinyl alcohol)-borax aqueous solutions. *Journal of Polymer Research* 10, 171-79.
161. Liu L., Berg R. A. (2002). Adhesion barriers of carboxymethylcellulose and PEO composite gels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 63: 326–32.
162. Liu Y., Chen S., Zhong L., Wu G. (2009). Preparation of high-stable silver nanoparticle dispersion by using sodium alginate as a stabilizer under gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry* 78, 251–5.

163. Lok C. N., Ho C. M., Chen R., He Q. Y., Yu W. Y., Sun H., Tam P. K. H., Chiu J. F., Che C. M. (2006) Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research* 5: 916-24.
164. Lopes C., Felisberti M. (2003) Mechanical behaviour and biocompatibility of poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone)-gelatin IPN hydrogels. *Biomaterials* 24: 1279-84.
165. Lorenz H. P., Longaker M. T. (2003). Wounds: Biology, Pathology, and Management. *Essential Practice of Surgery* 2003: 77-88.
166. Lozinsky V. I., Zubov A. L., Titov E. F. (1997). Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 2. Entrapped cells resemble porous fillers in their effects on the properties of PVA-cryogel carrier. *Enzyme and Microbial Technology* 20: 182-90.
167. Lozinsky V.I., Plieva F.M. (1998). Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and development. *Enzyme and Microbial Technology* 23: 227-42.
168. Lozinsky V. I., Galaev I. Y, Plieva F. M., Savina I. N., Jungvid H., Mattiasson B. (2003) Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *TRENDS in Biotechnology* 21(10): 445-51.
169. Lu Y., Mei Y., Schrinner M., Ballauff M., Moller M. W., Breu J. (2007) In situ formation of Ag nanoparticles in spherical polyacrylic acid brushes by uv irradiation. *Journal of Chemical Physics C* 111: 7676-81.
170. Lucas N., Legrand R., Breton J., Déchelotte P., Edwards-Lévy F., Fetissov S. O. (2015). Chronic delivery of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in rat hypothalamus using albumin-alginate microparticles: Effects on food intake and body weight. *Neuroscience* 2(290): 445-53.
171. Lugao A., Rogero S., Malmonge S. (2002) Rheological behaviour of irradiated wound dressing poly(vinyl pyrrolidone) hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry* 63: 543-6.
172. Ma R., Xiong D., Miao F., Zhang J., Peng Y. (2009). Novel PVP/PVA hydrogels for articular cartilage replacement. *Materials Science and Engineering C* 29: 1979-83.



173. Mahapatra S. K., Bogle K. A., Dhole S. D., Bhoraskar V. N (2007) Synthesis of gold and silver nanoparticles by electron irradiation at 5–15 keV energy. *Nanotechnology* 18(13): 1-5.
174. Maillard M., Giorgio S., Pileni M. P. (2002) Silver nanodisks. *Advanced Materials* 14(15): 1084-86.
175. Maillard M., Giorgio S., Pileni M. P. (2003) Tuning the size of silver nanodisks with similar aspect ratios: Synthesis and optical properties. *Journal of Physical Chemistry B* 107(11): 2466-70.
176. Majtan J. (2014) Honey: An immunomodulator in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 22(2): 187–92.
177. Mancini M., Moresi M., Rancini R. (1999) Mechanical properties of alginate gels: empirical characterization. *Journal of Food Engineering*, 39: 369–78.
178. Manojlović V. (2005) Uticaj spoljnog elektrostatičkog polja na veličinu proizvedenih mikročestica sa imobilisanom biomasom. *Magistarski rad*, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
179. Marie Arockianathan P., Sekar S., Sankar S., Kumaran B., Sastry T. P. (2012). Evaluation of biocomposite films containing alginate and sago starch impregnated with silver nano particles. *Carbohydrate Polymers* 90: 717–24.
180. Marius S., Lucian H., Marius M., Daniela P., Irina G., Romeo-Iulian O., Simona D., Viorel M. (2011). Enhanced antibacterial effect of silver nanoparticles obtained by electrochemical synthesis in poly(-amide-hydroxyurethane) media. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22: 789–96.
181. Martín M. J., Calpena A. C., Fernández F., Mallandrich M., Gálvez P., Clares B. (2015). Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 117:140-9
182. Martinsen A., Skjak-Braek G., Smidsrod O. (1989). Alginate as immobilization material; I. Correlation between chemical and physical

- properties of alginate gel beads. *Bioengineering and Biotechnology* 33: 79–89.
183. Martinez-Castanon G. A., Nino-Martinez N., Martinez-Gutierrez F., Martinez-Gendoza J. R., Ruiz F. (2008) Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research* 10: 1343–48
184. Masuda K., Sah R., Hejna M., Thonar E. J. (2003) A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *Journal of Orthopaedic Research*, 21:139–48.
185. Mauck R. L., Soltz M. A., Wang C. C., Wong D. D., Chao P. H. G., Valhmu W. B, Hung C. T., Ateshian G. A. (2000) Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *Journal of Biomechanical Engineering*, 122:252–260.
186. Mauck R. L., Seyhan S. L., Ateshian G. A., Hung C. T. (2002) Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels. *Annual Biomedical Engineering*, 30:1046–56.
187. Mazzoleni G., Di Lorenzo D., Steimberg N. (2009). Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes & Nutrition* 4: 13–22.
188. Mbhele Z. H., Salemane M. G., van Sittert C. G. C. E., Nedeljkovic J. M., Djokovic V., Luyt A. S. (2003). Fabrication and Characterization of Silver–Polyvinyl Alcohol Nanocomposites. *Chemistry of Materials* 15: 5019-24.
189. McFarland A. D., Duyne R. P. V. (2003). Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *Nanoletters* 3: 1057-62.
190. Meriç G., Dahl J. E., Eystein Ruyter I. (2008). Cytotoxicity of silica-glass fiber reinforced composites. *Dental Materials* 24: 1201-06.
191. Meyer U., Wiesmann H. P. (2006) Bone and Cartilage Engineering. Berlin Heidelberg: Springer; 7-24.

192. Migliaresi C., Motta A., DiBenedetto A. T. (2007) Injectabele scaffolds for bone cartilage regeneration. In: *Topics i Bone Biology: Engineering of functional skeletal tissue*. Bronner F., Farach-Carson M.C (eds.), Springer/Verlag London Limited, London, 95-109.
193. Milosavljević N., Milašinović N., Filipović J., Kalagasidis Krušić M. (2010) Sinteza i karakterizacija semi-interpenetrirajućih mreža hitozana i poli(n-vinil-2-pirolidona). *Hemijska industrija* 64 (6): 511–17.
194. Mitrovic D, Stojkovska J., Obradovic B. (2010). Ispitivanje mogućnosti kontrolisane razgradnje alginatnih mikročestica. *Hemijska industrija* 64(4): 253-63.
195. Mizuno S., Allemann F., Glowacki J. (2001) Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges. *Journal of Biomedical Materials Research* 56: 368-75
196. Mobasher A., Lewi M. (2013). Tissue engineered animal sparing models for the study of joint and muscle diseases. In: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. Andrades J. A. (ed.), 509-541. ISBN: 978-953-51-1108-5, InTech, DOI: 10.5772/55563. Available from: <http://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering/tissue-engineered-animal-sparing-models-for-the-study-of-joint-and-muscle-diseases>
197. Mochochoko T., Oluwafemi O. S., Jumbam D., Songca S. (2013) Green synthesis of silver nanoparticles using cellulose extracted from an aquatic weed; water hyacinth. *Carbohydrate Polymers* 98: 290–4
198. Moe S. T., Draget K. I., Skjak-Braek G., Smidsrod O. (1995) Alginates. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*. Stephen A.M. (ed.), NY: Marcel Dekker, 245-86.
199. Mohan Y. M., Lee K., Premkumar T., Geckeler K. E. (2007). Hydrogel networks as nanoreactors: a novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications. *Polymer* 48(1): 158-64.
200. Molan P. C. (1992) The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity *Bee World* 73: 5-28

201. Molan P. C. (2002) Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers – theory and practice. *Ostomy/Wound Management* 48 (11): 28-40.
202. Monteiro D. R., Gorup L. F., Takamiya A. S., Ruvollo-Filho A. C., Camargo E. R., Barbos D. B. (2009). The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34: 103-10.
203. Moore O. A., Smith L. A., Campbell F., Seers K., McQuay H. J., Moore R. A. (2001). Systematic review of the use of honey as a wound dressing. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 1: 2.
204. Moreira-Teixeira L., Georgi N, Leijten J., Wu L., Karperien M. (2011). Cartilage tissue engineering. In book: *Cartilage and Bone Development and Its Disorders*. Camacho-Hubner C., Nilsson O., Savendahl L. (eds). Endocr Dev. Basel, Karger, 21, 102-15.
205. Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramírez J. T., Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16: 2346–53.
206. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methodes* 65: 55-63.
207. Movia D., Prina-Mello A., Bazou D. Volkov Y., Giordani S. (2011). Screening the cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes using novel 3D tissue-mimetic models. *ACS Nano* 5, 9278–90.
208. Mow V. C., Ratcliffe A., Poole A. R. (1992) Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13: 67-97.
209. Murakami K., Aoki H., Nakamura S., Nakamura S., Takikawa M., Hanzawa M., Kishimoto S., Hattori H., Tanaka Y., Kiyosawa T., Sato Y., Ishihara M. (2010) Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials* 3: 83–90.

210. Nadagouda M. N., Varma R. S. (2007). Preparation of Novel Metallic and Bimetallic Cross-Linked Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites under Microwave Irradiation. *Macromolecular Rapid Communications* 28: 465-72.
211. Naik R. R., Stringer S. J., Agarwal G., Jones S. E., Stone M. O. (2002) Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nature materials* 1(3): 169-72.
212. Nam S. Y. Nho Y.C., Hong S. H., Hwa S., Chae G. T., Jang H. S., Suh T. S., Ahn W. S., Ryu K. E., Chun H. J. (2004). Evaluations of poly(vinyl alcohol) hydrogels cross-linked under  $\gamma$ -ray irradiation. *Macromolecular Research* 12(2): 219-24.
213. Narita T., Knaebel A., Munch J.-P., Candau S. J. (2001). Microrheology of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions and chemically cross-linked Gels. *Macromolecules* 34: 8224-31.
214. Nedović V. A. (1999) Imobilisani ćelijski sistemi u fermentaciji piva, Monografija, Zadužbina Andrejević, Beograd, ISBN 86-7244-104-4, 1-95.
215. Nerem R. M. (2000) Tissue engineering: confronting the transplantation crisis. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineerings Part H* 214:95-9.
216. Netti P. A, Ambrosio L. (2002) Articular cartilage. In: *Integrated Biomaterials Science*. Barbucci R. (ed), Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, 381-402.
217. Nguyen V. B., Wang C. X, Thomas C. R, Zhang Z. (2009) Mechanical properties of single alginate microspheres determined by microcompression and finite element modeling. *Chemical Engineering Science*, 64: 821-29.
218. Obradović B., Mišković-Stanković V., Jovanović Ž., Stojkowska J., Dobijanje mikročestica hidrogela alginata sa inkorporisanim nanočesticama srebra, (Production of alginate microbeads with incorporated silver nanoparticles), patent br. RS53508 (B1), Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije, od 27.02.2015.

219. Ogbonna J. C. In: Fundamentals of cell immobilisation biotechnology, Nedovic V., Willaert R. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, 327–41.
220. Orr D. E., Burg K. J. L. (2008) Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications. *Annals of Biomedical Engineering* 36: 1228–41.
221. Osmokrovic A., Obradovic B., Bugarski D., Bugarski B., Vunjak-Novakovic G. (2006). Development of a packed bed bioreactor for cartilage tissue engineering. *FME Transactions* 34: 65-70.
222. Otsuka E., Sasaki S., Koizumi K., Hirashima Y., Suzuki A. (2010). Elution of polymers from physically cross-linked poly(vinyl alcohol) gels. *Soft Matter* 6: 6155-59.
223. Ousey K, Cook L., Young T., Fowler A. (2012) Hydrocolloids in practice. *Wounds UK* 8(1): 1-6.
224. Pal S., Tak K. Y., Song M. J. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1712–20.
225. Pan Y. S., Xiong D. S., Ma R. Y. (2007) A study on the friction properties of poly(vinyl alcohol) hydrogel as articular cartilage against titanium alloy. *Wear* 262:1021–25.
226. Panáček A., Kvítek L., Pucek R., Kolář M., Večeřová R., Pizúrová N., Sharma V. K., Nevěčná T., Zbořil R. (2006) Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B* 110: 16248-53.
227. Panáček A., Kolář M., Večeřová R., Pucek R., Soukupová J., Kryštof V., Hamal P., Zbořil R., Kvítek L. (2009) Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 30: 6333–40.
228. Park K. R., Nho Y. C. (2003) Synthesis of PVA/PVP hydrogels having two-layer by radiation and their physical properties. *Radiation Physics and Chemistry* 67: 361–5.

229. Park J. H., Im K. H., Lee S. H., Kim D. H., Lee D. Y., Lee Y. K., Kim K. M., Kim K. N. (2005) Preparation and characterization of magnetic chitosan particles for hyperthermia application. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293: 328-33.
230. Park E. J., Yi J., Kim Y., Choi K., Park K. (2010). Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro* 24: 872-8.
231. Park J.-S. Kim H.-A., Choi J.-B., Hui-Gwon H.-J., Shin Y.-M., Lim Y. M. (2012). Effects of annealing and the addition of PEG on the PVA based hydrogel by gamma ray. *Radiation Physics and Chemistry* 81: 857-60.
232. Patel A. R, Vavia P. R. (2010) Evaluation of synthesized cross linked polyvinyl alcohol as potential disintegrant. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 13(2): 114-27.
233. Paul W., Sharma C. P. (2004). Chitosan and alginate wound dressings: A short review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* 18. 18-23.
234. Peppas N. A., Mongia N. K. (1997). Ultrapure poly(vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43(1): 51-8.
235. Petrovic M., Mitrakovic D., Bugarski B., Vonwil D., Martin I., Obradovic B. (2009). A novel bioreactor with mechanical stimulation for skeletal tissue engineering. *CI&CEQ* 15, 41-4.
236. Philip D. (2010) Honey mediated green synthesis of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A* 75: 1078-81.
237. Plavšić M. (2010) Polimerni molekuli i biomaterijali. In book: *Biomaterijali*. Raković D., Uskoković D. (eds.), Institut Tehničkih Nauka, Beograd, 567-602.
238. Pomfret S. J., Adams P. N., Comfort N. P, Monkman A. P. (2000) Electrical and mechanical properties of polyaniline fibres produced by a one-step wet spinning process. *Polymer* 41 (6): 2265-69.
239. Poncelet D., Babak V. G., Neufeld R. J., Goosen M., Bugarski B. (1999a). Theory of electrostatic dispersion of polymer solutions in the production

- of microgel beads containing biocatalyst. *Advances in Colloid and Interface Science* 79, 213-28.
240. Poncelet D., Neufeld R. J., Goosen M. F. A., Bugarski B., Babak V. (1999b). Formation of microgel beads by electrostatic dispersion of polymer solutions. *AIChE Journal* 45(9): 2018-23..
241. Prusse U., Vorlop K. D. (2004) In book: *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*. Nedovic V., Willaert R. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 295–309.
242. Qin Y. (2005). Silver-containing alginate fibres and dressings. *International Wound Journal* 2(2): 172-6.
243. Qin Y., Ji X., Jing J., Liu H., Ho Wu, Yang W. (2010) Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloid Surface A* 372: 172-6.
244. Queen D., Orsted H., Sanada H., Sussman G. (2004). A dressing history. *International Wound Journal* 1: 59–77.
245. Queen D. Technology update: Understanding hydrocolloids. *Wounds International* 2009; 1(1). Available at: <http://www.woundsinternational.com/article.php?issueid=1&contentid=129&articleid=229> [Accessed March 2012]
246. Quinn J. V. (1998) *Tissue Adhesives in wound care*, Hamilton. Ont. B.C. Decker, Inc.
247. Radzig M. A., Nadtochenko V. A., Koksharova O. A., Kiwi J., Lipasova V. A., Khmela I. A. (2013). Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102: 300–6.
248. Rahim S. N. A, Sulaiman A., Hamzah F., Hamid K. H. K, Rodhi M. N. M, Musa M., Edama N. A. (2013). Enzymes Encapsulation within Calcium Alginate-clay Beads: Characterization and Application for Cassava Slurry Saccharification. *Procedia Engineering* 68: 411-7.
249. Raimondi M.T. (2006) Engineered tissue as a model to study cell and tissue function from a biophysical perspective. *Current Drug Discovery Technologies* 3, 245-68.



250. Rajkov B., Radovanović T., Vidović M. (2007) Savremeni pristup u tretiranju hroničnih rana. *RANE: časopis Srpskog udruženja za lečenje rana* 1(1)
251. Ramsten J. J. (2014) What is Nanotechnology? *Applied Nanotechnology*, Second Edition. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-3189-3.00001-4>
252. Raveendran P., Fu J., Wallen S.L. (2006) A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles. *Green Chemistry* 8: 34–8.
253. Razzak M. T., Darwis D., Sukirno Z. (2001) Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. *Radiation Physics and Chemistry* 62: 107–13.
254. Reetz M. T., Helbig W. (1994) Size-selective synthesis of nanostructured transition metal clusters. *Journal of American Chemical Society* 116: 7401-2.
255. Rendel M., Mayer C., Weninger W., Tschachler E. (2001) Topically applied of lactic acid increases spontaneous secretion of vascular endothelial growth factor by human constructed epidermis. *British Journal of Dermatology* 145: 3-9.
256. Richards V. N., Rath N. P., Buhro W. E. (2010) Pathway from a molecular precursor to silver nanoparticles: the prominent role of aggregative growth. *Chemistry of Materials* 22, 3556–67.
257. Riddel J. P. Jr., Aouizerat B. E., Miaskowski C., Lillicrap D. P. (2007) Theories of blood coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, 24: 123–31.
258. Rodriguez-Sanchez L., Blanco M. C., Lopez-Quintela M. A. (2000) Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B* 104, 9683–8.
259. Rosiak J. M., Olejniczak J. (1993). Medical applications of radiation formed hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry* 42(4–6): 903–6.

260. Rosiak J. M., Ulanski P., Pajewski L. A., Yoshi F., Makuuchi K. (1995) Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments. *Radiation Physics and Chemistry* 46: 161–8.
261. Roy N., Saha N., Kitano T., Saha P. (2012) Biodegradation of PVP–CMC hydrogel film: A useful food packaging material. *Carbohydrate Polymers* 89: 346–53.
262. Ruparelia J. P., Chatterjee A. K., Duttgupta S. P., Mukherji S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia* 4: 707–16.
263. Rushton I. (2007) Understanding the role of proteases and pH in wound healing. *Nursing Standard* 21: 68-72.
264. Saha S., Pal A., Pande S., Sarkar S., Panigrahi S., Pal, T. (2009). Alginate gel-mediated photochemical growth of mono- and bimetallic gold and silver nanoclusters and their application to surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Physical Chemistry C* 113: 7553–60.
265. Saha S., Pal A., Kundu S., Basu S., Pal. T. (2010). Photochemical green synthesis of calcium-alginate-stabilized Ag and Au nanoparticles and their catalytic application to 4-nitrophenol reduction. *Langmuir* 26: 2885–93.
266. Sato K., Kikuchi S., Yonezawa T. (1999) *In Vivo* intradiscal pressure measurement in healthy individuals and in patients with ongoing back problems. *Spine* 24(23): 2468–74.
267. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7): 671–5.
268. Schneider L. A., Korber A., Grabbe S., Dissemond J. (2007) Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Arch Dermatol Res* 298: 413–20
269. Schexnailder P., Schmidt G. (2009) Nanocomposite polymer hydrogels. *Colloid and Polymer Science* 287: 1-11.
270. Schulz R.M, Bader A. (2007) Cartilage tissue engineering and bioreactor system for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *European Biophysics Journal* 36: 539-68.

271. Seo S. Y., Lee G. H., Lee S. G., Jung S. Y., Limc J. O., Choi S. H. (2012). Alginate-based composite sponge containing silver nanoparticles synthesized in situ. *Carbohydrate Polymers* 90: 109–15.
272. Shalaby W. S. W., Peck G. E., Park K. (1991) Release of dextromethorphan hydrobromide from freeze-dried enzyme-degradable hydrogels. *Journal of Controlled Release* 16:355-64.
273. Sharma B., Elisseeff J. (2004) Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Annals of Biomedical Engineering* 32:148–59.
274. Sharma V. K., Yngard R. A., Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 145: 83–96.
275. Sharma S., Sanpui P., Chattopadhyay A., Ghosh S. S. (2012). Fabrication of antibacterial silver nanoparticle—sodium alginate—chitosan composite films. *RSC Advances* 2: 5837-43.
276. Shchukin D. G., Radtchenko I. L., Sukhorukov G. B. (2003) Photoinduced reduction of silver inside microscale polyelectrolyte capsules. *ChemPhysChem* 4: 1101-3.
277. Shi Y., Xiong D. (2013) Microstructure and friction properties of PVA/PVP hydrogels for articular cartilage repair as function of polymerization degree and polymer concentration. *Wear* 305:280–5.
278. Shields S. P., Richards V.N., Buhro W.E. (2010). Nucleation control of size and dispersity in aggregative nanoparticle growth. A study of the coarsening kinetics of thiolate capped gold nanocrystals. *Chemistry of Materials* 22(10): 3212-25.
279. Shin H. S., Yang H. J., Kim S. B., Lee M. S. (2004). Mechanism of growth of colloidal silver nanoparticles stabilized by polyvinyl pyrrolidone in c-irradiated silver nitrate solution. *Journal of Colloid Interface Science* 274: 89–94.
280. Sittichockechaiwuta A., Scuttb A. M., Ryan A. J., Bonewald L. F., Reilly G. C. (2009) Use of rapidly mineralising osteoblasts and short periods of mechanical loading to accelerate matrix maturation in 3D scaffolds. *Bone*, 44:822-9.

281. Skrdla P.J., Robertson R. T. (2008). Use of Dispersive Kinetic Models To Describe the Rate of Metal Nanoparticle Self-Assembly. *Chemistry of Materials* 20(1): 3–4.
282. Slawson R. M.; Van Dyke M. I.; Lee H., Trevors J. T. (1992) Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. *Plasmid* 27: 72-9.
283. Smidsrod O. (1974) Molecular basis for some physical properties of alginates in gel state. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 57;263–74.
284. Smidrod O., Skjak-Bræk G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in biotechnology* 8: 71–8.
285. Sondi I., Salopek- Sondi B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275: 177–82.
286. Stammen J. A., Williams S., Ku D. N., Guldberg R. E. (2001) Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterials* 22: 799–806.
287. Stasica P., Rosiak J.M., Ciach M., Radek M. (2000) Approach to construct hydrogel intervertebral discs implants – experimental and numerical investigations. *Engineering of Biomaterials* 3: 9-14.
288. Stevens M. M., Qanadilo H. F., Langer R., Shastri V. P. (2004). A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 25: 887–94.
289. Stiufiuc R., Iacovita C., Lucaciu C. M., Stiufiuc G., Dutu A. G., Braescu C., Leopold N. (2013) SERS-active silver colloids prepared by reduction of silver nitrate with short-chain polyethylene glycol *Nanoscale Research Letter* 8(47): 1-5.
290. Stojkovska J., Bugarski B., Obradovic B. (2010). Evaluation of alginate hydrogels under in vivo-like bioreactor conditions for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21: 2869–79.

291. Stojkowska J. (2010) Ispitivanje biomaterijala i bioreaktorskih uslova koji imitiraju *in vivo* sredinu za inženjerstvo tkiva hrskavice i kosti. *Magistarski rad*, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
292. Stojkowska J., Obradovic B., Polimerni nanokompoziti sa inkorporisanim nanočesticama srebra i medom, P-2014/0200, Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije, od 22.04.2014.
293. Sung J-M. (2001). Nonisothermal phase formation kinetics in sol-gelderived strontium bismuth tantalate. *Journal of Material Research* 16: 2039–44.
294. Šitum M., Kolić M. (2012) Definicija i podjela atipičnih rana. *Acta Medica Croatica* 66 (1): 5-11.
295. Šerban N. (1995) Pokretne i Nepokretne ćelije. Beograd: Savremena administracija.
296. Taqieddin E., Amiji M. (2004). Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials* 25(10): 1937-45.
297. Temenoff J. S., Mikos A. G. (2000) Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21: 431-40.
298. Tian J., Wong K. Y., Ho C-M., Lok C-N., Yu W-Y., Che C-M., Chiu J-F., Tam P. K. H. (2007) Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. *ChemMedChem* 2: 129– 36.
299. Thomas A., Harding K. G., Moore K. (2000) Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Biomaterials*, 21: 1797-1802.
300. Thomas B. H., Fryman J. C., Liu K., Mason J. (2009). Hydrophilic–hydrophobic hydrogels for cartilage replacement. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2: 588–95.
301. Thomas J., Lowman A., Marcolongo M. (2003). Novel associated hydrogels for nucleus pulposus replacement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67A, 1320–37.

302. Thomas J., Gomes K., Lowman A., Marcolongo M. (2004). The effect of dehydration history on PVA/PVP hydrogels for nucleus pulposus replacement. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 69B: 135–40.
303. Thomas S, Loveless, P (1997). A comparative study of the properties of twelve hydrocolloid dressings. World Wide Wounds Available at: [http:// www.worldwidewounds.com](http://www.worldwidewounds.com)
304. Thomas V., Yallapu M. M., Sreedhar B., Bajpai S. K. (2007) A versatile strategy to fabricate hydrogel–silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity. *Journal of Colloid and Interface Science* 315: 389–95.
305. Thu B., Bruheim P., Espevik T., Smidsrod O., Soon-Shiong P., Skjak-Braek G. (1996) Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials* 17:1031–40.
306. Trajković V., Marković Z. (2010) Nanomedicina: Stanje i perspektiva. In book: *Biomaterijali*. Rakovic D., Uskoković D. (eds), Institut tehničkih nauka Srpeke akademije nauke i umetnosti, Beograd, 762-75.
307. Tranquilan-Aranilla C., Yoshii F., Dela Rosa A. M., Makuuchi K. (1999). Kappa-carrageenan–polyethylene oxide hydrogel blends prepared by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 55: 127–31.
308. Travan A., Pelillo C., Donati I., Marsich E., Benincasa M., Scarpa T., Semeraro S., Turco G., Gennaro R., Paoletti S. (2009) Non-cytotoxic silver nanoparticle-polysaccharide nanocomposites with antimicrobial activity. *Biomacromolecules* 10: 1429-35.
309. Tripathi S., Mehrotra G. K., Dutta P. K. (2009) Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecule* 45(4): 372–6.
310. Tseng C. H., Wang C. C., Chen C. Y. (2006) Polypropylene fibers modified by plasma treatment for preparation of Ag nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B* 110: 4020–9.

311. Turtay M. G., Firat C., Samdanci E., Oguzturk H., Erbatur S., Colak C. (2010) Effects of montelukast on burn wound healing in a rat model. *Clinical & Investigative Medicine* 33 (6): E413-E421.
312. Urban J. P. (1993) The effect of physical factors on disk cell metabolism. U: *Musculoskeletal soft-tissue aging: impact on mobility*. Buckwalter J.A., Goldberg V.M., Woo S.L. (eds), Am Acad Orthop Surg Rosemont, IL, 391–412.
313. Valeriote F., van Putten L (1975) Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents: a review. *Cancer Research* 35: 2619-30.
314. Valodkar M., Modi S., Pal A., Thakore S. (2011). Synthesis and antibacterial activity of Cu, Ag and Cu–Ag alloy nanoparticles: A green approach. *Materials Research Bulletin* 46: 384–9.
315. Van Phu D., Duy N. N., Hien N. Q. (2013) Study of incorporation of silver nanoparticles onto PE-g-PAAc nonwoven fabric by  $\gamma$ -irradiation for water treatment. *Radiation Physics and Chemistry* 88: 90–4.
316. Van Susante J. L. C., Buma P., van Osch G. J. V. M., Versleyen D., van der Kraan P. M., van der Berg W. B., Homminga G. N. (1995) Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 66:549-56.
317. Varaprasad K., Vimala K., Ravindra S., Narayana Reddy N., Venkata Subba Reddy G., Mohana Raju K. (2011). Fabrication of silver nanocomposite films impregnated with curcumin for superior antibacterial applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22(8): 1863-72.
318. Varshney L. (2007). Role of natural polysaccharides in radiation formation of PVA–hydrogel wound dressing. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* 255: 343–9.
319. Velings N. M., Mestdagh M. M. (1995). Physico-Chemical Properties of Alginate Gel Beads. *Polymer Gels and Networks* 3(3): 311-30.
320. Versteeg H., Heemskerk J., Levi M., Reitsma P. (2013) New fundamentals in hemostasis. *Physiology Review* 93: 327–58.

321. Vidovic S., Zvicer J., Stojkovska J., Miskovic-Stankovic V., Obradovic, B. (2012). Nanocomposite microfibers based on alginate and PVA hydrogels with incorporated silver nanoparticles. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 6: 189.
322. Visavadia B., Honeysett J., Danford M. (2008) Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 46: 55–6.
323. Vrana N. E., Liu Y., McGuinness G. B., Cahill P. A. (2008) Characterization of Poly(vinyl alcohol)/Chitosan Hydrogels as Vascular Tissue Engineering Scaffolds. *Macromolecular Symposia* 269: 106–110.
324. Vreeker R., Li L., Fang Y., Appelqvist I., Mendes E. (2008). Drying and rehydration of calcium alginate gels. *Food Biophysics* 3: 361–9.
325. Vunjak-Novakovic G., Freed L. E., Biron R. J., Langer R. (1996) Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage. *AIChE J.* 42:850-860.
326. Xiang D. X., Chen Q., Pang L., Zhenga, C. L. (2011). Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *Journal of Virological Methods* 178. 137–142.
327. Xiang Y., Chen D. (2007) Preparation of a novel pH-responsive silver nanoparticle/poly (HEMA–PEGMA–MAA) composite hydrogel. *European Polymer Journal* 43(10): 4178-87.
328. Yamamoto T., Yin H.B., Wada Y., Kitamura T., Sakata T., Mori H., Yanagida S. (2004). Morphology-control in microwave-assisted synthesis of silver particles in aqueous solutions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 77: 757-61.
329. Yang J., Pan J. (2012). Hydrothermal synthesis of silver nanoparticles by sodium alginate and their applications in surface-enhanced Raman scattering and catalysis. *Acta Materialia* 60(12): 4753–8.
330. Yang J., Chen J., Pan D., Wan Y., Wang Z. (2013). pH-sensitive interpenetrating network hydrogels based on chitosan derivatives and alginate for oral drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 92(1): 719-25.



331. Yang L., Zhang H.-Y., Yang Q., Lu D. (2012). Bacterial cellulose-poly(vinyl alcohol) nanocomposite hydrogels prepared by chemical crosslinking. *Journal of Applied Polymer Science* 126: 244-50.
332. Yin B., Ma H., Wang S., Chen S. (2003). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles under protection of poly(N-vinylpyrrolidone). *Journal of Physical Chemistry B* 107: 8898-904.
333. Yu D., Yam V. W.-W. (2005). Hydrothermal-induced assembly of colloidal silver spheres into various nanoparticles on the basis of HTAB-modified silver mirror reaction. *Journal of Physical Chemistry B* 109(12): 5497-503.
334. Yu H., Xu X., Chen X., Lu T., Zhang P., Jing X. (2007). Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* 103: 125-33.
335. Wang C. X., Cowen C., Zhang Z., Thomas C. R. (2005) High-speed compression of single alginate microspheres. *Chemical Engineering Science* 60: 6649-57.
336. Wang H., Xueliang Qiao X., Chen J., Wang X., Ding S. (2005). Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics* 94: 449-53.
337. Wang J. F., Olson M. E., Reno C. R., Wright J. B., Hart D. A. (2001) The pig as a model for excisional skin wound healing: characterization of the molecular and cellular biology, and bacteriology of the healing process. *Comparative Medicine* 51 (4) 341-8.
338. Wang M., Xu L., Hu H., Zhai M., Peng J., Nho Y., Li J., Wei G. (2007). Radiation synthesis PVP/CMC hydrogels as wound dressing. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 265: 385-9.
339. Wang N., Grad S., Stoddart M. J., Niemeyer P., Südkamp N. P., Pestka J., Alini M., Chen J., Salzman G. M. (2013). Bioreactor-induced chondrocyte maturation is dependent on cell passage and onset of loading. *Cartilage* 4: 165-76.

340. Wang X. Q., Itoh H., Naka K., Chujo Y., (2003) Tetrathiafulvalene-assisted formation of silver dendritic nanostructures in acetonitrile. *Langmuir* 19: 6242-46.
341. Wang Y., Li Y., Yang S., Zhang G., An D., Wang C., Yang Q., Chen X., Jing X., Wei Y. (2006). A convenient route to polyvinyl pyrrolidone/silver nanocomposite by electrospinning. *Nanotechnology* 17(13): 3304-7.
342. Wang W., Wang A. (2010) Synthesis and swelling properties of pH-sensitive semi-IPN superabsorbent hydrogels based on sodium alginate-g-poly(sodium acrylate) and polyvinylpyrrolidone. *Carbohydrate Polymers* 80: 1028-36.
343. Weber M., Steinert A., Jork A., Dimmler A., Thurmer F., Schutze N., Hendrich C., Zimmermann U. (2002) Formation of cartilage matrix proteins by BMP-transfected murine mesenchymal stem cells encapsulated in a novel class of alginates. *Biomaterials* 23: 2003-13.
344. Wilke H. J., Neef P., Caimi M., Hoogland T., Claes L. E. (1999) New *in vivo* measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine*, 24(8): 755-62.
345. Wong M. (2004) Alginate in tissue engineering. In: *Methodes in molecular biology. Biopolymer methodes in tissue engineering*. Hollander A. P, Hatton P. V (eds.), Human Press Inc., Totowa, NY., 77-86.
346. Zhang D., Weinbaum S., Cowin S. C. (1998) Estimates of the peak pressures in bone pore water. *Journal of Biomechanical Engineering* 120: 697-703.
347. Zhang J., Chen P., Sun C., Hu X. (2004) Sonochemical synthesis of colloidal silver catalysts for reduction of complexing silver in DTR system. *Applied Catalysis A: General* 266: 49-54.
348. Zhang J., Daubert C. R., Foegeding E. A. (2007) A proposed strain-hardening mechanism for alginate gels. *Journal of Food Engineering* 80:157-65.
349. Zhang L. Z., Yu J. C., Yip H. Y., Li Q., Kwong K. W., Xu A. W., Wong P. K. (2003) Ambient Light Reduction Strategy to Synthesize Silver

Nanoparticles and Silver-Coated TiO<sub>2</sub> with Enhanced Photocatalytic and Bactericidal Activities. *Langmuir* 19: 10372-80.

350. Zheng X. W., Zhu L. Y., Yan A. H., Wang X. J., Xie Y. (2003) Controlling synthesis of silver nanowires and dendrites in mixed surfactant solutions. *Journal of Colloid Interface Science* 268: 357-61.
351. Zheng X. W., Zhu L. Y., Wang X. J., Yan A. H., Xie Y. (2004) A simple mixed surfactant route for the preparation of noble metal dendrites *Journal of Crystal Growth* 260: 255-62.
352. Zheng Y., Huang X., Wang Y., Xu H., Chen X. (2009). Performance and characterization of irradiated poly(vinyl alcohol)/polyvinylpyrrolidone composite hydrogels used as cartilage replacement. *Journal of Applied Polymer Science* 113: 736-41.

## Biografski podaci

Jasmina Pavić, udata Stojkowska, je rođena 01.03.1979. g. u Beogradu. Gimnaziju u Obrenovcu, prirodno - matematički smer, završila je 1998. g. Iste godine upisala je studije na Biološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Studije je završila u junu 2004. g. sa srednjom ocenom 8,89 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Školske 2005/06. g. upisala je posle diplomске studije, odsek Biohemijsko inženjerstvo, na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. U oktobru 2010. g. odbranila je magistarsku tezu pod nazivom "Ispitivanje biomaterijala i bioreaktorskih uslova koji imitiraju *in vivo* sredinu za inženjerstvo tkiva hrskavice i kosti" i stekla zvanje magistar tehničkih nauka. Doktorsku disertaciju nastavila je da radi na istom fakultetu pod rukovodstvom prof. dr Bojane Obradović.

Pohađala je i sa uspehom položila završne ispite na četiri međunarodne letnje škole iz oblasti biomedicinskog inženjerstva i biopolimera. Takođe, pohađala je više seminara i treninga iz oblasti zaštite intelektualne svojine, transfera tehnologije i preduzetništva.

U zvanje istraživač-pripravnik izabrana je 25. maja 2006. g., a u zvanje istraživač-saradnik 22. decembra 2010. g, a u toku je postupak za reizbor u zvanje. Od 1. septembra 2006. g. zaposlena je na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Do sada Jasmina Stojkowska je učestvovala u realizaciji 1 međunarodnog naučno-istraživačkog projekta i 4 naučno-istraživačka projekta finansiranih od nadležnog Ministarstva Republike Srbije, kao i u 1 COST akciji.

Jasmina Stojkowska je autor 10 radova objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima, 1 rada objavljenog u nacionalnom naučnom časopisu, 21 rada saopštenih na skupovima međunarodnog značaja štampanih u izvodu, 17 radova saopštenih na skupovima nacionalnog značaja štampanih u izvodu, 1 realizovanog patenta i 1 patentne prijave. Kao član tima dobitnica je dve Zlatne medalje sa likom Nikole Tesle na Međunarodnoj izložbi pronalazaka, novih tehnologija i industrijskog dizajna „Pronalazaštvo-Beograd 2011” i „Pronalazaštvo-Beograd 2012”. Tim je takođe pobedio na Takmičenju za najbolju tehnološku inovaciju u Srbiji 2011. g. Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, u grupi Zdravlje i u

celokupnoj kategoriji Inovativne ideje, a zatim je dobio i nagradu za najbolje plasirani ženski tim na Takmičenju za najbolju tehnološku inovaciju u Srbiji 2012. g. u kategoriji Realizovane inovacije.

U cilju promocije nauke držala je predavanje po pozivu u okviru „Noći istraživača 2014” pod nazivom „Bioinženjering tkiva”.

Govori engleski jezik.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Јасмина Стојковска  
број индекса \_\_\_\_\_

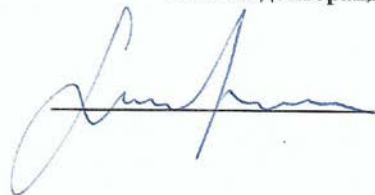
**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом  
ДОБИЈАЊЕ И КАРАКТЕРИСАЊЕ НАНОКОМПОЗИТНИХ ХИДРОГЕЛОВА НА  
БАЗИ АЛГИНАТА И НАНОЧЕСТИЦА СРЕБРА ЗА ПРИМЕНУ У  
БИОМЕДИЦИНИ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 26. 06. 2015.

**Потпис докторанда**



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Јасмина Стојковска

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм ХЕМИЈА И ХЕМИЈСКА ТЕХНОЛОГИЈА

Наслов рада ДОБИЈАЊЕ И КАРАКТЕРИСАЊЕ НАНОКОМПОЗИТНИХ ХИДРОГЕЛОВА НА БАЗИ АЛГИНАТА И НАНОЧЕСТИЦА СРЕБРА ЗА ПРИМЕНУ У БИОМЕДИЦИНИ

Ментор Проф. др Бојана Обрадовић

Потписани/а Јасмина Стојковска

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 26.06.2015.



### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ДОБИЈАЊЕ И КАРАКТЕРИСАЊЕ НАНОКОМПОЗИТНИХ ХИДРОГЕЛОВА НА БАЗИ АЛГИНАТА И НАНОЧЕСТИЦА СРЕБРА ЗА ПРИМЕНУ У БИОМЕДИЦИНИ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 26. 06. 2015.

