

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Tijana M. Lužajić Božinovski

**ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI
NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA SREBRO /
POLIVINIL-ALKOHOL / GRAFEN U POTKOŽNOM
TKIVU PACOVA, NAMENJENIH
BIOMEDICINSKOJ PRIMENI**

doktorska disertacija

Beograd, 2018. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Tijana M. Lužajić Božinovski

**BIOCOMPATIBILITY OF SILVER / POLY(VINYL
ALCOHOL) / GRAPHEN NANOCOMPOSITE
HYDROGELS IN RAT SUBCUTANEOUS TISSUES
FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

doctoral thesis

Belgrade, 2018

MENTORI:

dr Danica Marković, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Vera Todorović, redovni profesor

Stomatološki fakultet Pančevo Univerziteta Privredna akademija, Novi Sad

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Danica Marković, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Vera Todorović, redovni profesor

Stomatološki fakultet Pančevo Univerziteta Privredna akademija, Novi Sad

dr Vesna Mišković-Stanković, redovni profesor

Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu

datum odbrane: _____

Beograd

Zahvalnica

Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekata "Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja" (ev. br. IO 175061), čiji je rukovodilac prof. dr Milica Kovačević-Filipović i "Sinteza, razvoj tehnologija dobijanja i primena multifunkcionalnih materijala definisanih svojstava" (ev. br. III 45019), čiji je rukovodilac prof. dr Đorđe Janačković, a koji su finansirani od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Eksperimentalni deo je urađen na Katedri za histologiju i embriologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu i u Službi za patohistologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu.

Zahvaljujem se mentorki prof. dr Danici Marković jer mi je prva pružila šansu, ukazala mi poverenje uz bezrezervnu podršku i pomoć u svakom trenutku, davala korisne savete i sugestije tokom mog istraživačkog rada.

Zahvaljujem se mentorki prof. dr Veri Todorović na izuzetnoj požrtvovanosti i stručnom vođenju u svim koracima nastanka ove teze, od planiranja i izvođenja eksperimenta do predstavljanja rezultata, na stručnoj pomoći i smernicama u pisanju i uobličavanju doktorske disertacije, kao i što me je nesebično uvela u svet nauke i otkrila draži i kompleksnost histologije.

Zahvaljujem se prof. dr Vesni Mišković-Stanković koja je sa svojim timom sintetisala i okarakterisala hidrogelove srebro/polivinil-alkohol i srebro/polivinil-alkohol/grafen i pružila mi priliku da budem deo tima koji istražuje ove savremene nanokompozitne materijale.

Želela bih da se posebno zahvalim prof. dr Ivanu Nikoliću i asist. dr Marku Joviću sa Instituta za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, kao i mr sci. Nedi Drndarević iz BeoLab laboratorije (Medicover) oko kolegijalne i prijateljske pomoći u vezi realizacije nekih imunohistohemijskih reakcija.

Od srca se zahvaljujem prof. dr Aniti Radovanović na podršci, razumevanju i dragocenim savetima.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegama, Ivanu Miloševiću i Jeleni Danilović Luković, na razumevanju, moralnoj i psihološkoj podršci.

Zahvaljujem se svojoj porodici i Filipu na beskrajnom strpljenju i podršci. Svaki uspeh u životu i sve ono što je dobro i vredno posvećujem vama.

ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA SREBRO / POLIVINIL-ALKOHOL / GRAFEN U POTKOŽNOM TKIVU PACOVA, NAMENJENIH BIOMEDICINSKOJ PRIMENI

Rezime

Ova doktorska disertacija dizajnirana je u cilju da se ispita biokompatibilnost dva novosintetisana i prethodno *in vitro* okarakterisana hidrogela na bazi sintetskog polimera polivinil-alkohola – Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, koji su namenjeni za izradu obloga za rane ili za implantate za meka tkiva.

Polivinil-alkohol (PVA) je sintetički polimer koji se često koristi u biomedicini zbog svoje netoksičnosti, rastvorljivosti, biokompatibilnosti, elastičnosti i sposobnosti stvaranja reverzibilnih hidrogelova s visokom sposobnošću sorpcije. U poslednjih nekoliko godina, istraživanja se takođe fokusiraju na ugradnju grafena (Gr) u hidrogelove PVA kako bi se poboljšala njihova mehanička čvrstoća i trajnost. U inženjerstvu tkiva i regenerativnoj medicini posebno je važno da implantati i zavoji sadrže antiinflamatornu i antibakterijsku aktivnu komponentu kako bi zaštitili sterilnost rane ili sprečili infekciju u tkivu koje okružuje implantat. Poznato je da nanočestice srebra (*eng.* silver nanoparticles, AgNPs) poseduju odličnu antibakterijsku aktivnost, pa se zbog toga često koriste kao aktivna komponenta biomaterijala na bazi hidrogela od PVA.

U cilju ispitivanja biokompatibilnosti novosintetisanih hidrogelova, praćena je reakcija mekog tkiva na duboko potkožno postavljene implantate od Ag/PVA i Ag/PVA/Gr i poređena je sa reakcijom na komercijalnu oblogu za rane na bazi kalcijum-alginata (*Suprasorb*®, *Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Germany*), koja je implantirana na identičan način. Procenjivan je tkivni iritacioni indeks (Iri) kao osnovna mera tkivnog odgovora na implantirane hidrogelove. Za određivanje stepena biokompatibilnosti merena je debljina vezivnotkivne kapsule oko implantiranih hidrogelova, broj inflamatornih ćelija, uključujući i Langerhansove džinovske ćelije, broj makrofaga u periimplantnoj zoni i njihova enevntualna migracija u biomaterijal, kao i brojnost krvnih sudova mikrovaskularnog korita oko zone implantacije. Posmatran je odnos proliferacije i apoptoze ćelijskih entiteta kože i potkožnog tkiva odgovornih za procese regeneracije i reparacije. Procenjivana je

ekspresija važnih komponenti ekstracelularnog matriksa (ECM), kolagena tipa I, kolagena tipa III i laminina u koži u zoni implantacije i vezivnotkivnoj kapsuli oko implantata, da bi se dobio uvid u stepen remodelovanja ECM.

Globalni zaključak o biokompatibilnosti kod *in vivo* aplikovanih Ag/PVA i Ag/PVA/Gr u supkutano tkivo pacova, na osnovu svih dobijenih parametara je da su oba materijala biokompatibilna, jer lokalno pokreću i vode biološke procese koji kao krajnji cilj imaju zarastanje rane, rekonstrukciju tkiva i integraciju materijala. Oba implantirana hidrogela dovode do stvaranja tanke kapsule sa malom količinom kolagena, indukuju stvaranje dobro vaskularizovane vezivnotkivne kapsule i perikapsularnog supkutanog vezivnog tkiva i stimulišu invaziju makrofaga, koji verovatno pozitivno regulišu procese regeneracije bez prateće fibroze. Razlike u ispitivanim parametrima između aplikovanih Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, ukazuju da se u slučaju aplikacije Ag/PVA/Gr stvara deblja kapsula, nesto jače infiltrirana inflamatornim ćelijama i sa većim brojem Langerhansovih džinovskih ćelija, ali istovremeno i sa većim brojem makrofaga koji su se registrovali u implantatu i nakon 60. dana od aplikacije ovog hidrogela. To ukazuje da dodavanje grafena u Ag/PVA može da na specifični način modulira različite biološke odgovore tkiva u toku procesa zarastanja rane, regeneracije i integracije.

Ključne reči: biokompatibilnost, hidrogelovi, srebro, polivinil-alkohol, grafen

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Histologija i embriologija

UDK broj: 591.8:57.089:544.772.432

BIOCOMPATIBILITY OF SILVER / POLY(VINYL ALCOHOL) / GRAPHEN NANOCOMPOSITE HYDROGELS IN RAT SUBCUTANEOUS TISSUES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Summary

This doctoral dissertation was designed in order to test the biocompatibility of two newly synthesized and previously *in vitro* characterized hydrogels based on poly(vinyl alcohol) polymers - Ag/PVA and Ag/PVA/Gr, which are intended for making wound dressings or soft tissue implants tissue.

Poly(vinyl alcohol) (PVA) is a synthetic polymer commonly used in biomedicine due to its non-toxicity, solubility, biocompatibility, elasticity and the ability to produce reversible hydrogels with high sorption capacity. In the last few years, research has also focused on the incorporation of graphene (Gr) into hydrogel PVAs, in order to improve their mechanical strength and durability. In tissue engineering and regenerative medicine, it is particularly important that implants and bandages contain an antiinflammatory and antibacterial active ingredient to protect the sterility of the wound, or to prevent infection in the implant surrounding tissue. It is known that silver nanoparticles (AgNPs) have excellent antibacterial activity and are therefore often used as an active component of PVA-based hydrogel biomaterials.

In order to test the biocompatibility of newly synthesized hydrogels, the soft tissue response to deep subcutaneously implanted Ag/PVA and Ag/PVA/Gr implants was compared to the reaction to the commercial calcium-alginate wound pad (Suprasorb ©, Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Germany), which is implanted in an identical manner. The tissue irritation index (IrI) was evaluated as the basic measure of tissue response to implanted hydrogels. In order to determine the degree of biocompatibility, the thickness of the connective tissue capsule around the implanted hydrogels, the number of inflammatory cells, including the Langerhans giant cells, the number of macrophages in the perimplant zone and their eventual migration to the biomaterial, as well as the number of blood vessels around the implantation zone, were measured. The ratio of proliferating and apoptotic cellular skin and subcutaneous tissue cellular entities was observed, due to their responsibility for regeneration and reparation processes. The expression of the extracellular matrix (ECM) important components,

collagen type I, collagen type III and laminin in the peri-implantation zone, were evaluated to obtain an overview of the ECM remodeling.

On the basis of all obtained parameters, the global conclusion is that both examined hydrogels Ag/PVA and Ag/PVA/Gr are biocompatible, because they locally initiate and lead biological processes which, as the ultimate goal, have wound healing, reconstruction tissue and material integration. Both implanted hydrogels lead to the formation of a thin capsule, with small amount of collagen content, induce the formation of a well vascularized connective tissue capsule and pericapsular subcutaneous tissue and stimulate an invasion of macrophages, which probably positively regulate regeneration processes without associated fibrosis. The differences in the parameters tested between the Ag/PVA and Ag/PVA/Gr applications indicated that Ag/PVA/Gr produces a some thicker capsule, a little bit more infiltrated by inflammatory cells and with a larger number of Langerhans giant cells, but at the same time with a higher number of macrophages that were registered in the implant even after 60 postimplantation day. This indicates that the addition of graphene in Ag/PVA can specifically modulate different tissue biological responses in the course of the healing process, regeneration and integration.

Key words: biocompatibility, hydrogels, silver, poly(vinyl alcohol), graphen

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Histology and Embryology

UDC Number: 591.8:57.089:544.772.432

SADRŽAJ:

1.	UVOD.....	1
2.	PREGLED LITERATURE.....	2
2.1.	POLIVINIL-ALKOHOL.....	2
2.1.1.	Struktura, sinteza, fizička i hemijska svojstva PVA.....	2
2.1.2.	Hidrogelovi na bazi polivinil-alkohola i njihova primena.....	3
2.2.	GRAFEN.....	7
2.2.1.	Definicija i otkriće.....	7
2.2.2.	Osobine grafena i njegovih hemijskih derivata.....	10
2.2.3.	Sinteza i dobijanje grafena.....	15
2.2.4.	Primena grafena u industriji.....	16
2.2.5.	Primena grafena u medicini.....	18
2.3.	SREBRO.....	24
2.4.	HIDROGELOVI.....	26
2.4.1.	Hidrogelovi u poređenju sa gelovima.....	27
2.4.2.	Klasifikacija hidrogelova.....	28
2.4.3.	Potencijalna primena <i>pametnih hidrogelova</i> u tkivnom inženjerstvu..	31
2.5.	BIOKOMPATIBILNOST.....	34
2.5.1.	Definicija biokompatibilnosti i šta određuje biokompatibilnost.....	34
2.5.2.	Biokompatibilnost PVA i hidrogelova na bazi PVA.....	35
2.5.3.	Biokompatibilnost grafena <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	36
3.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	37
4.	MATERIJAL I METODE.....	38
4.1.	ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA I METODE KARAKTERIZACIJE NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA.....	38
4.1.1.	Sinteza PVA i PVA/Gr hidrogelova.....	38
4.1.2.	Elektrohemijska sinteza nanokompozitnih hidrogelova od Ag/PVA i Ag/PVA/Gr.....	38
4.2.	EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE I PROCEDURA IMPLANTACIJE HIDROGELOVA.....	39
4.2.1.	Hirurška tehnika implantacije.....	40
4.2.2.	Monitoring eksperimentalnih životinja.....	42
4.3.	HISTOLOŠKA ISPITIVANJA.....	42
4.3.1.	Priprema histoloških preparata.....	42
4.3.2.	Hematoksilin-eozin bojenje.....	43
4.3.3.	AZAN trihromsko bojenje.....	44
4.3.4.	Određivanje indeksa tkivne iritacije (iritacionog indeksa) u zoni implantacije hidrogelova, na osnovu histoloških ispitivanja.....	44
4.4.	MORFOMETRIJSKA ISPITIVANJA.....	46

4.5.	IMUNOHISTOHEMIJSKA ISPITIVANJA.....	48
4.5.1.	Primarna antitela.....	48
4.5.2.	Princip i protokol dvostepene indirektno imunohistohe- mijske tehnike sa dekstranskim polimernim lancem obeleženim peroksidazom rena.....	58
4.5.3.	Semikvantitativna procena stepena vaskularizacije, ekspresije laminina i kolagena tipa I i III u koži i zoni oko implantata.....	60
4.5.4.	Određivanje brojnosti makrofaga (CD68 pozitivnih).....	61
4.5.5.	Određivanje brojnosti ćelija u proliferaciji (Ki67 pozitivnih).....	62
4.5.6.	Određivanje brojnosti apoptotskih ćelija (ssDNA pozitivnih).....	62
4.6.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	62
5.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	63
5.1.	HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ISPITIVANJA PARAMETARA ZA PROCENU TKIVNOG IRITACIONOG INDEKSA.....	63
5.1.1.	Indeks iritacije tkiva.....	64
5.1.2.	Morfološke promene koje određuju vrednost indeksa iritacije tkiva...	68
5.1.3.	Dubina infiltracije leukocita u implantat iz periimplantne zone.....	79
5.1.4.	Džinovske ćelije tipa oko stranog tela lokalizovane oko supkutanih implantata od različitih hidrogelova.....	83
5.1.5.	Oblik i dimenzije hidrogelova Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba nakon implantacije.....	89
5.2.	IMUNOHISTOHEMIJSKA ISTRAŽIVANJA	90
5.2.1.	Ekspresija glatkomišićnog aktina u krvnim sudovima i stepen vaskularizacije vezivnotkivne kapsule i neposredne zone oko kapsule.....	90
5.2.2.	Ekspresija laminina u koži kod subkutane aplikacije različitih hidrogelova.....	99
5.2.3.	Ekspresija kolagena tipa I i kolagena tipa III u koži kod supkutane aplikacije različitih hidrogelova.....	111
5.2.4.	Makrofagi u periimplantnoj zoni kod supkutane aplikacije Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba.....	123
5.2.5.	Indeks proliferacije keratinocita epidermisa i fibroblasta periimplan- tne zone kod supkutane aplikacije hidrogelova Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba.....	136
5.2.6.	Apoptoza u epitelnim ćelijama epidermisa kože i fibroblastima peri- implantne zone kod supkutane aplikacije Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Supra- sorba.....	144
6.	DISKUSIJA.....	147
7.	ZAKLJUČCI.....	162
8.	LITERATURA.....	164

1. UVOD

Hidrogelovi su trodimenzionalne mreže hidrofilnih polimera koje su međusobno povezane kovalentnim vezama ili drugim kohezivnim silama, kao što su vodonične ili jonske veze. U medicinskim i farmaceutskim naukama, to su biomaterijali za koje se smatra da će u bliskoj budućnosti imati širu neposrednu primenu u regeneraciji i reparaciji tkiva zahvaljujući svojim važnim karakteristikama, kao što su biokompatibilnost, biorazgradivost, hidrofilnost i netoksičnost. Ovi materijali su skafoldi za tkivno inženjerstvo. Hidrogelni nosači mogu imati ulogu tkivnih barijera i bioadheziva, mogu da služe kao depoi lekova ili kao materijali za isporučivanje bioaktivnih grupa koje podstiču prirodne reparativne procese. Takođe, hidrogelovi mogu biti namenjeni, ne samo topikalnoj primeni u svrhu zarastanja rana i zaceljenja patoloških promena na koži, već i transdermalnoj aplikaciji ili u cilju oslobađanja i održavanja efektivnih koncentracija lekova u sistemske cirkulaciji.

Polivinil-alkohol (PVA) je sintetički polimer koji se često koristi u biomedicini zbog svoje netoksičnosti, rastvorljivosti, biokompatibilnosti, elastičnosti i sposobnosti stvaranja reverzibilnih hidrogelova s visokom sposobnošću sorpcije. U poslednjih nekoliko godina, istraživanja se takođe fokusiraju na ugradnju grafena (Gr) u hidrogelove PVA, kako bi se poboljšala njihova mehanička čvrstoća i trajnost. U inženjerstvu tkiva i regenerativnoj medicini posebno je važno da implantati i zavoji sadrže antiinflamatornu i antibakterijsku aktivnu komponentu kako bi zaštitili sterilnost rane ili sprečili infekciju u tkivu koje okružuje implantat. Poznato je da nanočestice srebra (*eng.* silver nanoparticles, AgNPs) poseduju odličnu antibakterijsku aktivnost, pa se zbog toga često koriste kao aktivna komponenta biomaterijala na bazi hidrogela od PVA.

Tim profesorke Vesne Mišković-Stanković sa Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu sintetisao je nove polimerne hidrogelove, Ag/PVA i Ag/PVA/Gr i u potpunosti okarakterisao ove savremene materijale u pogledu fizičko-hemijskih karakteristika i *in vitro* biokompatibilnosti. Stoga je logičan sled u istraživanjima bio da se ispita njihova biokompatibilnost *in vivo*, s obzirom da su namenjeni upotrebi kao obloge za rane ili implantati za meka tkiva. Ispitivanje biokompatibilnosti Ag/PVA i Ag/PVA/Gr tema je ove doktorske disertacije.

2. PREGLED LITERATURE

U ovom poglavlju biće sažeto izneta dosadašnja saznanja o materijalima od kojih su sintetizovani hidrogelovi korišćeni u istraživanjima u okviru doktorske disertacije (polivinil-alkohol - PVA, grafen i nanopartikule srebra), kao i podaci o hidrogelovima i njihovoj primeni. Posebno će biti prikazan problem biokompatibilnosti materijala, sa naročitim osvrtom na hidrogelove koji su izgrađeni na bazi PVA ili grafena.

2.1. POLIVINIL-ALKOHOL

2.1.1. Struktura, sinteza, fizička i hemijska svojstva PVA

Herman i saradnici su još 1924. godine otkrili i razvili metodu za sintezu **polivinil-alkohola (PVA)**. PVA predstavlja sintetičko vlakno koje poseduje odlična različita mehanička svojstva. On je, takođe, i sirovinski materijal za "vinilon", prvo sintetičko vlakno izrazite jačine od kojeg je i napravljen PVA hidrogel. PVA se ne koristi samo za proizvodnju vlakana izrazite jačine, već služi i kao sirovina za filmove i acetilne smole, zatim kao sredstvo za obradu tekstila, kao adhezivni agens, stabilizator polimerizacije polivinil-hlorida i neorgansko vezivo. Polivinil alkohol je sintetički hidrofilni linearni polimer, bezbojan i bez mirisa, rastvorljiv u vodi. Ima idealizovanu formulu $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$. U smislu mikrostrukture sastoji se uglavnom od 1,3-diolnih veza $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-]$, kao što je prikazano u idealizovanoj formuli, ali sadrži i nekoliko procenata 1,2-diola $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-]$, zavisno od uslova polimerizacije vinil-estarskog prekursora. Broj monomera u PVA $[(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n]$ varira od 500 do 5000, pa i molekulska masa može da varira od 20.000 do 200.000 Da [Finch, 1992].

Za razliku od većine vinil-polimera, PVA se ne priprema polimerizacijom odgovarajućeg monomera. Monomer, vinil-alkohol, nestabilan je i brzo se tautomerizuje u acetaldehid, pa se polimerizacija vinil-alkohola dobija rastvaranjem drugog polimera, polivinil-acetata (PVAc) u alkoholu (npr. metanolu) i naknadnim tretiranjem s alkalnim katalizatorom (npr. NaOH). Dobijena hidroliza ili reakcija „alkoholize” uklanja acetatne grupe iz molekula PVAc bez narušavanja njihove trajne strukture. Svojstva polimera zavise od količine preostalih estarskih grupa. Kada se reakcija „alkoholize” nastavi do kraja, nastali produkt je veoma rastvorljiv u vodi i nerastvorljiv u gotovo svim

organskim rastvaračima. Nepotpuno uklanjanje acetatnih grupa dovodi do stvaranja PVA slabije rastvorljivog u vodi, a rastvorljivog u nekim organskim rastvaračima. Ponekad se za dobijanje PVA koriste i drugi prekursorski polimeri, npr. s formijatom, hlороacetatnim grupama umesto acetata itd. Strukturna svojstva PVA prvenstveno zavise od molekulske mase polimera i stepena hidrolize, odnosno procenta vinilalkohola u polimeru [*Finch, 1992; Matsumura, 2005; Muppalaneni i Omidian, 2013.*].

Fizička svojstva sintetičkog polimera PVA zavise od metode dobijanja, molekulske mase, taktičnosti (izotaktičan, sindiotaktičan ili ataktičan PVA), stepena polimerizacije i stepena hidrolize. Svojstva poput viskoznosti, otpornosti na rastvaranje, čvrstoće adhezije, čvrstoće na istezanje i oblikovanje filmova, poboljšavaju se s povećanjem molekulske mase i stepena hidrolize [*Marten, 2002*]. S druge strane, temperatura topljenja prvenstveno zavisi od stepena hidrolize i taktičnosti [*Finch, 1992*]. Što se tiče hemijskih svojstava, potrebno je istaći da je, zbog svojstva kristalizacije, struktura PVA vrlo stabilna i hemijski inertna, ali PVA ostvaruje reakcije kao i svi drugi sekundarni polihidridni alkoholi.

2.1.2. Hidrogelovi na bazi polivinil-alkohola i njihova primena

Hidrogelovi su trodimenzionalne unakrsno vezane hidrofilne mreže polimernih vlakana, umrežene fizičkim ili hemijskim vezama koje obezbeđuju strukturu mreže. Mreže se mogu sastojati od jednog (homo-) ili više polimera (kopolimerni hidrogelovi). Specifičnost ovih materijala proističe iz njihove sposobnosti da vežu veliku količinu vode ili bioloških tečnosti. S obzirom na male količine gelirajuće supstance i veliki udeo tečnosti (i do 99 %), hidrogelovi imaju gustinu blisku vrednosti gustine vode, ali poseduju strukturnu povezanost čvrste supstance. Termodinamička kompatibilnost sa vodom im omogućava bubrenje u vodenim medijumima. Zavisno od stepena hemijskog ili fizičkog unakrsnog povezivanja, količina apsorbirane vode varira, pa se hidrogelovi mogu svrstati u hidrogelove sa malim, srednjim i velikim sadržajem vode.

Hidrogelovi PVA, zbog osetljivosti na vezivanje vodonika i prekomernu kristalizaciju, obično poseduju vrlo nizak kapacitet bubrenja, što ih čini poželjnim za specifičnu primenu u medicini i farmaciji [*Omidian i sar., 2005*]. Formaldehid, glutaraldehid i ketoni se najčešće koriste u pripremi hemijski unakrsno vezanih hidrogelova PVA [*Mallapragada i McCarthy-Schroeder, 2000*]. Međutim, te materije

su toksične i određena količina inicijatora unakrsnog povezivanja uvek zaostaje u konačnom polimeru, a načini za postizanje njegove prihvatljive i sigurne koncentracije nisu uvek ni laki ni pouzdani. Molekulska težina sastojaka između dve tačke unakrsne veze ili gustina unakrsne veze, određuju konačna svojstva polimera, kao što su kapacitet bubrenja, mehanička čvrstoća, brzina otpuštanja leka i njegova stabilnost. Takva poželjna svojstva ugrožena su povećanim nivoom toksičnosti hidrogela i složenim pročišćavanjem pri višoj koncentraciji inicijatora povezivanja. Preostali inicijatori povezivanja zbog njihove funkcionalnosti i reaktivnosti, imaju snažan potencijal da reaguju s bioaktivnim materijama ili lekovima, te mogu menjati terapijska svojstva konačnog oblika doziranog leka. Međutim, hidrogel PVA u kome su lanci PVA povezani pomoću poliuretanskih lanaca, nije toksičan i predstavlja novi supstrat u tkivnom inženjerstvu hrskavice koji je primenjen na zečjem modelu [*Shokrgozar i sar., 2013*].

Kako bi se rešile komplikacije u vezi sa upotrebom hemijskih poprečnih veza, poželjna je primena fizičkih metoda za dobijanje hidrogelova na bazi PVA. Fizičko unakrsno povezivanje vrši se primenom zračenja ili ciklusa zaleđivanja i odleđivanja, kao i jonotropnim geliranjem. Hidrogelovi proizvedeni zračenjem nude bolja svojstva otpuštanja leka od hidrogelova koji su proizvedeni uz pomoć temperature, ali njihov nedostatak su slaba mehanička svojstva [*Mallapragada i McCarthy-Schroeder, 2000*]. Generalno, hidrogelovi dobijeni fizičkim metodama ispoljavaju reverzibilna svojstva koja ugrožavaju njihovu stabilnost.

Vodeni rastvori polimera PVA visoke molekulske mase (50.000-130.000 Da), visoke koncentracije (10-20 mas.%) i visokog stepena hidrolize (> 98%), mogu se uspešno kriogelirati pod uslovima zamrzavanja i odmrzavanja. Hidroksilne grupe susednih polimernih lanaca stupaju u interakciju i formiraju slabe intra- i intermolekularne vodonične veze, što rezultira formiranjem kristalita. Parametri koji utiču na kriogeni tretman jesu temperatura zamrzavanja/ odmrzavanja, broj ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, brzina zamrzavanja i, najvažniji, uslovi odmrzavanja [*Lozinsky, 1998*]. Budući da se rastvor PVA u vodi pretvara iz tečnog u čvrsto stanje tokom kriogelacije, sastav polimera tokom takvog prelaza određuje elastična, viskozna i viskozno-elastična svojstva kriogelova. Slično svim ostalim hidrogelnim supstancama, PVA kriogelovi pripremljeni pri visokoj koncentraciji polimera ili pod uslovima koji

pojačavaju mehanička svojstva, pokazuju elastična svojstva, dok će viskozna svojstva biti favorizovana u uslovima suprotnim od navedenih. Generalno, budući da su polimer PVA i voda jedine komponente hidrogela, njegove osobine mogu da se modiliraju kako bi se postigla poželjna viskozno-elastična svojstva. Tako se npr. stepen unakrsnog povezivanja i viskozno-elastična svojstva povećavaju s povećanjem broja ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, a kinetika bubrenja linearno se menja s kvadratnim korenom vremena. Takođe, hidrogelovi PVA više bubre u vodi na višim temperaturama [Takigawa i sar., 1990]. U kriogelovima dobijenim fizičkim metodama kristaliti su termodinamički nestabilni pri višim temperaturama, odnosno kristaliti će početi da se tope na temperaturama oko temperature staklastog prelaza polimera. Stoga je toplotna stabilnost PVA poželjna ukoliko je planirana primena PVA na mestima gde će mikrookruženje doživeti promenu temperature. Toplotna stabilnost kriogela može se pojačati dodavanjem surastvarača ili stabilizatora [Lozinsky, 1998] ili dodavanjem termootpornih minerala. Poput promena viskoznosti s vremenom, takođe se očekuje da se stepen kristalizacije u kriogelu menja s vremenom, što dovodi do promene mehaničkih svojstava [Muppalaneni i Omidian, 2013].

Polimeri PVA mogu se kombinovati s drugim različitim polimerima (**kopolimeri**) ili drugim materijama u cilju pripreme **kompozitnih/hibridnih hidrogelova** radi poboljšanja svojstava, kao što su pH osetljivost, biokompatibilnost, profil oslobađanja leka itd. Tako su opisani hidrogelovi PVA u kombinaciji s poliakrilnom kiselinom [Mc Gann i sar., 2000], natrijum-alginatom [Bichara i sar., 2010], rogačom [Kaity i sar., 2013], hidroksietil-skrobom i inkorporisanim ampicilinom [Kenawy i sar., 2014], želatinom [Pal i sar., 2013], polietilen-glikolom [Gadea i sar., 2013], fibroinom svile [Kundu i sar., 2012], celulozom [Gonzalez i sar., 2014], celulozom i grafen-oksidom [Xue i sar., 2015], hitozanom [Dashtdar i sar., 2015], nano-hidroksiapatitom [Wu i sar., 2007], hijaluronanom i inkorporisanim nanopartikulama srebra [Zhang i sar., 2013], titanijumskim vlaknima [Kobayashi i Oka, 2004.], akrilnom kiselinom i metil-metakrilatom [Xu i sar., 2014] i slično.

Zbog svoje jednostavne strukture i jedinstvenih svojstava, kao što su adhezivnost, čvrstoća, formiranje filmova, biokompatibilnost, hidrofilnost, sigurnost pri upotrebi i nekarcinogenost, polimeri PVA pronašli su primenu u različitim granama industrije, uključujući tekstilnu industriju, industriju proizvodnje papira i lepaka,

proizvodnju hrane, kao i primenu u biomedicini i farmaceutskoj industriji i kozmetologiji [Saxena, 2004; Muppalaneni i Omidian, 2013]. Vršena su istraživanja ovih hidrogelova kao potencijalnih mekih materijala za izgradnju kontaktnih sočiva [Hyon i sar., 1994], veštačke rožnjače i staklastog tela [Bakhshandeh i sar., 2011; Jiang i sar., 2014], kardiovaskularnih implantata i graftova [Alexandre i sar., 2014], veštačke hrskavice i meniskusa [Bichara i sar., 2010; Shokrgozar i sar., 2013; Dashtdar i sar., 2015; Hayes i Kennedy, 2016], implantata za regeneraciju kostiju i izradu proteza [Kobayashi i Oka, 2004; Guo i sar., 2014], supstrata za rast ćelija [Kim i sar., 2015], kod pripreme za brahiterapiju prostate [Li i sar., 2015], biomaterijala koji se koristi protiv stvaranja priraslica intraperitonealno i oko oštećenih tetiva [Kobayashi i sar., 2001; Deerenberg i sar., 2012], nosača za lekove [Basak i Adhikari, 2009; Mc Gann i sar., 2009; Kundu i sar., 2012; Kaity i sar., 2013; Xu i sar., 2014], uključujući i produženo otpuštanje antibiotika u veterinarskoj medicini [Moretto i sar., 2004], obloga za rane [Pal i sar., 2007; Zhang i sar., 2013; Gonzalez i sar., 2014; Kenawy i sar., 2014, Kamoun i sar., 2017] i druga istraživanja.

Tek 1985. godine Oka i saradnici su počeli da istražuju potencijalnu kliničku primenu PVA- hidrogelova u polju ortopedske hirurgije, izvršili su brojne eksperimente i razvili PVA-hidrogelove kao implante kakvi se koriste danas [Oka i sar., 1997; Kobayashi i Oka, 2004; Kobayashi i Hyon, 2010; Masanori i Hyon, 2010]. Sa velikim optimizmom potrebno je sagledati rezultate prve kliničke studije na ljudima sa dugoročnim praćenjem (5–8 godina) uspešnosti primene komercijalnog implantata od PVA hidrogela (*Cortiva, RTI Surgical Inc, FL, SAD*) u terapiji fokalnih defekata hrskavice kolena. Ti rezultati pokazali su da sintetički implantati hidrogela PVA garantuju funkcionalni oporavak kolenog zgloba sa fokalnim defektima hrskavice kod pacijenata srednjeg životnog doba [Scaretta, 2013]. Najnovija istraživanja su pokazala da kompozitni hidrogel, sastavljen od PVA i hitozana, može da se koristi kao nosač za mezenhimalne matične ćelije prilikom terapije fokalnog defekta hrskavice [Dashtdar i sar., 2015]. U poređenju sa drugim hidrogelovima, svojstvo PVA hidrogelova da slabo adsorbuju proteine, rezultira niskom ćelijskom adhezijom, što ih, po mišljenju nekih autora, u poređenju sa drugim hidrogelovima čini manje efikasnim u lečenju defekta hrskavice tzv. MACT-metodom – metodom autologne transplantacije hondrocita

vezanih za matriks (*engl. matrix-associated autologous chondrocyte transplantation, MACT*) [Baker i sar., 2012].

Objavljeni su preliminarni rezultati kliničke studije na ljudima o obnavljanju zglobne površine metakarpalne kosti primenom implantata od PVA kod pacijenata sa osteoartritisom [Taleb i sar., 2014], a odlični klinički rezultati dobijeni su pet godina nakon prve metatarzofalangealne hemiartroplastike sa istim implantatom [Daniels i sar., 2017]. Hidrogel u vidu kopolimera PVA (50%) i fibroina svile (50%) uspešno je upotrebljen u tkivnom inženjerstvu aurikularne hrskavice, pa se očekuju dalja pretklinička istraživanja sa ovim novim biomaterijalom [Lee i sar., 2017].

Kao što je već napomenuto, hidrogelovi PVA korišćeni su u istraživanjima i kao zavoji u lečenju rana [Pal i sar., 2007; Zhang i sar., 2013; Gonzalez i sar., 2014; Kenawy i sar., 2014], a danas smo svedoci komercijalno dostupnih polimernih hidrogelova od PVA, polivinil-pirolidona i polietilen-oksida namenjenih oblogama za rane (npr. *Ciltinova Gel, TegaGel, Exu Dry Dressing CarraSorb* itd.) [Kamoun i sar., 2017].

2.2. GRAFEN

2.2.1. Definicija i otkriće

Grafen je tanak list čistog ugljenika debljine jednog atoma ili dvodimenzionalni kristalni alotrop ugljenika [Baruhović, 2014]. U ovom monosloju atomi ugljenika su hibridizovani sp^2 -vezama sa parcijalno ispunjenom p-orbitom u heksagonalne strukture, debljine jednog atoma ugljenika i dužine od nekoliko mikrometara. To je prvi dvodimenzionalni materijal koji je napravio čovek [Novoselov i sar., 2004; Geim, 2009; Marinković, 2011].

Grafen se praktično prostire u jednoj ravni, a njegova heksagonalna struktura kristalne rešetke je stabilna kada se u njoj nalazi najmanje 24000 atoma ugljenika za koje je karakteristično „talasanje” atoma amplitude jednog nm. Dvodimenzionalni grafen zadržava visoku pokretljivost elektrona na sobnoj temperaturi i grafenski elektroni mogu da pređu hiljade međuatomskih rastojanja bez skretanja. Ugljenik gradi dva tipa veza: jedne (sp^3) koje omogućavaju strukturu dijamanta tako da je svaki atom vezan sa tri susedna atoma u tetraedarskom rasporedu (dakle nisu sve veze u istoj ravni), i druge (sp^2) kod kojih je takođe svaki atom vezan za tri susedna atoma, ali

vezama koje su sve u istoj ravni, kao u pčelinjem saću. Pakovanjem tih ravnih slojeva sa sp^2 -vezama dobija se grafit. Ako bi se uopšte moglo govoriti o debljini, sloj ugljenikovih atoma u ovom materijalu (koji je alotropska modifikacija običnog ugljenika), tanak je kao trista milijarditih delova milimetra (0,333 nm) [Marinković, 1978; Marinković i sar., 1999; Novoselov i sar., 2004; Geim, 2009; Marinković, 2011].

Grafen je jedan sloj grafita koji je dovoljno izolovan od svoje okoline da se može smatrati samostalnim. Grafit debljine jednog milimetra sadrži tri miliona slojeva grafena naslaganih jedan na drugi, koji su međusobno labavo povezani. Za razliku od toga, ugljenikovi atomi u grafenu su čvrsto povezani intermolekularnim vezama, a rastojanje između njih iznosi 0,142 nm, što predstavlja prosek rastojanja jednostruke (C–C) i dvostruke (C=C) kovalentne σ -veze, kao što je slučaj u benzenskom prstenu [Marinković, 1978; Marinković i sar., 1999; Castro i sar., 2009; Mak i sar., 2010; Marinković, 2011].

Grafen je još 1947. godine privukao pažnju naučnika, kada su i započeta prva teorijska istraživanja [Wallace, 1947]. Ovaj naučnik dao je proračune o jedinstvenoj elektronskoj strukturi grafena. Godinu dana kasnije slike grafita sa nekoliko slojeva grafena, dobijene transmisionim elektronskim mikroskopom, objavili su fizičari Ruess i Vogt [Ruess i Vogt, 1948]. Ovi istraživači su pripremili grafen termalnom redukcijom GO u protoku vodonika. Nešto kasnije, na elektronskom mikroskopu snimljen je jedan sloj grafena [Baruhović, 2014], a 1962. godine izolovan je slobodan grafen redukcijom GO sa hidrazinom. Ovaj pronalazak je u početku prošao nezapaženo i sledećih godina su vršena samo teorijska istraživanja grafena. Od 1987. godine koristi se pojam grafen, koji su u nauku uveli Mouras i sar. [Mouras i sar., 1987]. Istraživači su dugi niz godina, počev od 1990. pokušavali da, stanjivanjem grafita, dobiju grafenski monosloj, međutim, i pored velikog broja ponavljanja, pokušaji su bili bezuspešni jer su dobijeni samo grafiti sa 50 do 100 slojeva. To je učvrstilo postojeće mišljenje da samostalni grafeni ne mogu da opstanu zbog termičke nestabilnosti, za razliku od stabilnih zakrivljenih struktura kao što su čađ, fulereni ili nanocevi, pa bi se nastali grafen odmah pretvorio u jedan od takvih oblika. Naime, priroda striktno „zabranjuje” rast malodimenzionalnih kristala. Rast kristala uključuje visoku temperaturu, pa stoga termičke fluktuacije razorno deluju na stabilnost makroskopskih 1D i 2D oblika. Mogu se dobiti ravni molekuli i kristaliti nanodimenzija, ali kako njihova širina raste, naglo

rastu i termičke vibracije, koje su na makroskali različite u različitim pravcima. Zbog toga se 2D kristaliti raspadaju u niz stabilnih 3D struktura [Marinković, 1978; Marinković i sar., 1999; Marinković, 2011].

Veliki ulaz grafena u nauku počinje 2004. godine, kada su dva mlada naučnika uspela da na Univerzitetu u Mančesteru (Engleska) laboratorijski izdvoje jednoatomski sloj ugljenika iz grafita i tako reše dilemu o njegovoj nestabilnosti. Godine 2004. Andre Gejm (1958) i Konstantin Novosjolov (1974) sa saradnicima, objavili su radove u kojima su saopštili da su dobili „samostalne atomske kristale koji su striktno dvodimenzionalni i mogu da se shvate kao pojedinačne atomske ravni izvađene iz masivnih kristala grafita ili kao odmotane jednoslojne nanocevi”. Ovi ruski naučnici sa Univerziteta u Mančesteru dobili su Nobelovu nagradu za fiziku 2010. godine za „revolucionarne eksperimente sa dvodimenzionalnim materijalom grafenom” [Novoselov i sar., 2004; Geim, 2009; Marinković, 2011]. Gejm i Novosjolov uspeli su da tzv. *tehnikom lepljive trake* (koja se drugačije naziva i *mikromehaničko cepanje, mehanička piling metoda* ili *tehnika „škotske trake”*) izdvoje grafen iz visoko orijentisanog pirolitičkog grafita. Oni su, koristeći ovu vrlo jednostavnu metodu, uzastopno stanjivali grafitni kristal do krajnjih granica uz pomoć lepljive trake (selotejpa), pa su tako stanjeni grafit, radi ispitivanja, prenosili na posebno pripremljenu oksidisanu silicijumovsku pločicu. Takvim postupkom uspeli su da dobiju kristale velikog strukturnog i elektronskog kvaliteta. Ovo otkriće odrazilo se na brojne oblasti nauka, od kvantne fizike, preko elektronike, do medicine [Abudabbus i sar., 2016]. Od velikog značaja se pokazala primena grafena u oblasti nanotehnologija, jer grafen, svojim izuzetnim mehaničkim, elektronskim i termičkim svojstvima [Geim, 2009], odlično funkcioniše kao komponenta kompozitnih polimera [Kim i sar., 2010], elektronskih [Di i sar., 2008] i biomedicinskih uređaja [Ang i sar., 2011].

Vodeća institucija, u Evropi i u svetu, koja se bavi istraživanjima grafena jeste Nacionalni institut za grafen u Mančesteru, čija je izgradnja počela 2013. godine, a završena je 2015. godine, uz veliku finansijsku pomoć Evropske unije i znatna ulaganja Velike Britanije, a jedan od direktora instituta je i nobelovac Konstantin Novosjolov (www.graphene.manchester.ac.uk. Retrieved 2015-11-30).

2.2.2. Osobine grafena i njegovih hemijskih derivata

Grafen je rodonačelnik cele serije ugljeničnih materijala. Kao krajnji u nizu bio bi grafit sa (teorijski) beskrajnim nizom grafenskih slojeva, odnosno pirokarbon, koji se može smatrati grafitom sa defektima. Tu spadaju i fulereni i nanocevi [Marinković, 2011].

Kao što je već istaknuto, grafen predstavlja prvi prirodni 2D atomski kristal koji se nalazi u heksagonalnoj sp^2 -hibridizovanoj kristalnoj rešetki. Ova hibridizacija atoma ugljenika, karakteristična za ugljenične nanomaterijale, nastaje superpozicijom jedne $2-s$ i dve $2-p$ orbitale. Ove hibridizovane orbitale su orijentisane u xy ravni i imaju zajedničke uglove od 120° , a preostala nehibridizovana orbitala je u prostoru normalna na njihovu ravan. Atomi ugljenika su u rešetki povezani jakim kovalentnim vezama. Zbog fleksibilnosti i jake valentnosti hemijskih veza, ugljenik ima veliki broj alotropskih modifikacija – dijamant, grafit, fuleren, grafen, ugljenične nanotube itd. Alotropi ugljenika imaju drugačije fizičke, hemijske i morfološke osobine, koje su posledica njihove različite atomske strukture i različitog načina međusobnog vezivanja atoma ugljenika. Svaka od tri sp^2 -orbitale atoma ugljenika formira σ -vezu sa tri susedna atoma ugljenika i na taj način se formira heksagonalna struktura grafena koja ima bazu od dva atoma po jediničnoj ćeliji. Veze ugljenik-ugljenik koje su σ -veze, predstavljaju jake kovalentne veze odgovorne za stabilnost rešetke i za elastične osobine grafena. Interakcije između susednih $2-p_z$ orbitala razvijaju se u delokalizovane π (vezujuće) nivoe koji formiraju valentnu zonu i π^* (antivezujuće) nivoe koji formiraju provodnu zonu. Nivoi π i π^* u grafenu se degenerativni u uglu (K-tačka ili Dirakova tačka) heksagonalne Brillouinove zone. Za niske energije, koje se povezuju sa transportom elektrona, nivoi imaju linearnu disperziju. Struktura tih nivoa se može posmatrati u vidu dva konusa koji se dodiruju u tački E_D (takozvano Dirakovo presecanje energije). Pošto se valentna i provodna zona dodiruju u toj tački, grafen ima nulti energetska procep i zbog toga se naziva semimetal. Nulti energetska procep u grafenu jeste rezultat identičnog okruženja dva atoma ugljenika u jediničnoj ćeliji grafena. Zbog toga je ključ za otvaranje energetskog procepa u grafenu razbijanje bočne simetrije rešetke u ravni, strukturalnim ili hemijskim modifikacijama. Na primer, ako se neki atomi ugljenika u heksagonalnoj rešetki zamene drugim atomima (npr. azotom), razbija se simetrija rešetke, čime dolazi do formiranja procepa između π i π^* nivoa.

Simetrija se može razbiti i slaganjem dva sloja grafena koji su uređeni Bernalovim načinom slaganja (AB slaganje). Pošto jedinična ćelija sadrži četiri atoma, dvoslojni grafen ima dva skupa valentnih i provodnih nivoa. U prisustvu jakog električnog polja, koje je normalno na dvostruku ravan grafena, gornja valentna zona i donja provodna zona se odvajaju formirajući direktni procep. Još jedna, veoma uspešna i često istraživana strategija, oslanja se na kvantno ograničenje i ivične efekte, odnosno krojenje 2D grafenskih listova u 1D nanotrake ili 0D kvantne tačke [Avouris, 2010; Lu i sar., 2013; Tošić, 2016].

Posebnost grafena je da se elektroni iz π -orbitala, odnosno elektronskih vrpca, kreću vrlo brzo, kao da su bez mase. Tipične čestice bez mase – fotoni, u vakuumu se kreću brzinom svetlosti, 300.000 km/s, dok se elektroni u grafenu kreću trista puta sporije, ali su takođe bezmasenog karaktera. Zato se za elektrone u grafenu kaže da su bezmaseni nosioci naboja, koji mogu u potpunosti da prođu kroz potencijalne prepreke, iako nemaju dovoljno energije da ih „preskoče”. Izmereno je da je pokretljivost nosilaca naelektrisanja $> 200000 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ pri gustinama elektrona od $2 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$. Kroz grafen možemo istovremeno provesti veliki broj elektrona, što ukazuje na njihovu značajnu mobilnost kao nosilaca naboja. Mobilnost elektrona u grafenu je veća nego u bilo kom drugom poznatom materijalu. Bitno je naglasiti da ta svojstva dolaze do izražaja na sobnoj temperature, gde grafen pokazuje dobru vodljivost, dok je materijale, kao što su visokotemperaturni supervodiči, potrebno ohladiti na temperaturu koja je stotine stepeni ispod sobne, da bi se pokazala dobra svojstva vodljivosti bez električnog otpora [Novoselov i sar., 2014; Novoselov i sar., 2005; Tošić, 2016].

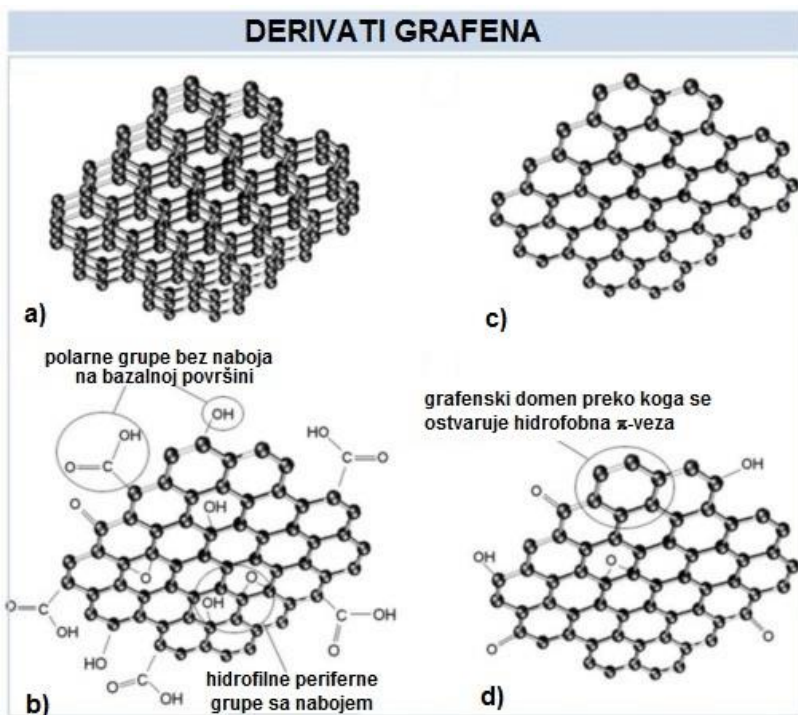
Grafen je najtanji materijal poznat u svemiru i najjači do sada izmereni materijal (zbog guste mreže sp^2 -veza). Ima izvanredne mehaničke, toplotne i elektro-karakteristike, koje prevazilaze sve do sada poznate osobine metala. On ima dobru električnu provodnost, veliku površinu, dobre elastične karakteristike, dobru termalnu provodljivost, osobinu da se lako funkcionalizuje, hemijsku inertnost, nepropustljivost za gasove, kao i niz drugih osobina [Novoselov i sar., 2004; Geim, 2009; Novoselov, 2011; Gurunathan i Kim, 2016; Guazzo i sar., 2018].

Grafen je vrlo lak, njegova spec. težina iznosi $0,77 \text{ mg/m}^2$ i 1000 puta je lakši od iste površine papira. Slikovito prikazano, grafen težine jednog grama može da pokrije površinu fudbalskog igrališta, a cigla izgrađena od grafena mogla bi da se izbalansira na

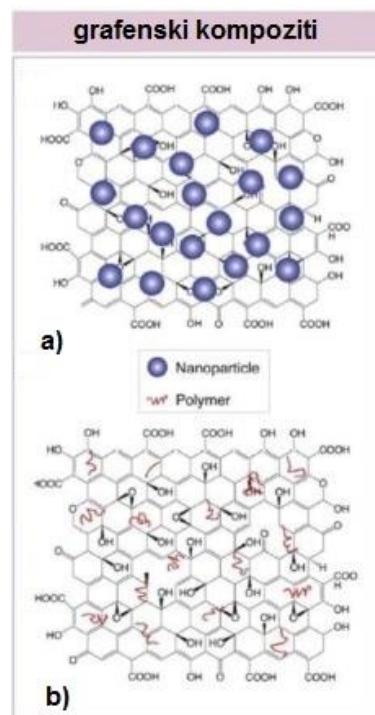
vrhu cveta. Grafen je skoro providan i apsorbira svega 2,3% bele svetlosti, što je posledica neobične niskoenergetske elektronske strukture grafenskog monosloja. Izuzetno je čvrst, 100–300 puta je čvršći od čelika, a tvrđi je od dijamanta. Od čeličnog lista iste debljine grafen je skoro sto puta otporniji na kidanje. Grafen je elastičan, s obzirom da je vrednost Jungovog (*Young*) modula dobijena Ramonovom spektroskopijom za mono- i bilejer grafena $2,4 \pm 0,4$ TPa i $2,0 \pm 0,5$ TPa, a koeficijent elastičnosti iznosi 1–5 N/m. Membrane od GO ne propuštaju gasove ni pare, osim vodene pare. Izuzetno je dobar provodnik toplote i električne energije. Termička provodnost mu je 13 puta veća nego kod bakra. Osobina mu je da je polumetal koji ima nulti zazor poluprovodnika. Specifični otpor grafena ($10^{-6} \Omega \times \text{cm}$) manji je od specifičnog otpora srebra, koje ima najmanju specifičnu otpornost. Grafen ima izrazito veliku pokretljivost elektrona na sobnoj temperaturi, preko $15.000 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, i ona je skoro nezavisna od temperature. Međutim, za grafen na podlozi od SiO rasipanje elektrona je veće i to snižava granicu pokretljivosti na $40000 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. Njegovi nosači naboja pokazuju ogromnu intrinzičnu pokretljivost, imaju nultu delotvornu masu i na sobnoj temperaturi mogu da putuju mikrometrima bez raspršivanja. Elektronski transport u grafenu opisan je Dirakovom jednačinom. Konačno, grafen ima osobinu da sam „popravlja” rascepe u svojim slojevima, ako su tu prisutni molekuli koji sadrže ugljenik (npr. ugljovodonici). Kada se rascepi u slojevima bombarduju atomima ugljenika, oni se potpuno zatvaraju, pri čemu se novopridošli atom ugljenika sasvim uklapa u otvore i u potpunosti prati šestougao nu strukturu kristalne rešetke [Marinković, 1977; Marinković i sar., 1999; Geim, 2009; Mak i sar., 2010; Marinković i sar., 2011; Lu i sar., 2013; Gurunathan i Kim, 2016; Guazzo i sar., 2018].

Poslednjih nekoliko godina grafen i njegovi derivati prepoznati su kao nove klase nanomaterijala. Grafen može da se javi u više oblika, tj. postoje različiti derivati grafena – grafen sa nekoliko slojeva, GO, grafenski nanolistovi i nanotrake i redukovani GO (rGO) (sl. 2.1). Grafen može da gradi i kompozite, kao što su kompoziti nanopartikula GO i kompoziti polimera GO (sl. 2.2) [Jastrzębska i sar., 2012; Zhao i sar., 2017; Guazzo i sar., 2018]. Postoje i druge klasifikacije grafena, koje se zasnivaju na njegovim različitim karakteristikama, npr. aranžman slojeva i izgled ivice. Na osnovu aranžmana slojeva, razlikujemo ABAB tip (Bernalovo slaganje slojeva), ABCABC tip (rombohedralno slaganje slojeva) i AAA tip. Na osnovu izgleda ivice,

razlikujemo grafene sa cik-cak motivom ili sa motivom stolice (cik-cak i stolične nanotrake).



Slika 2.1. Različiti nanomaterijali bazirani na grafenu: a) grafen od nekoliko slojeva; b) oksid grafena (GO); c) grafenski nanolistovi, d) redukovani oksid grafena (rGO).
(modifikovano po Jastrzebska i sar., *J Nanopart Res.* 2012;14:1320–1340.)



Slika 2.2. Grafenski kompozit: a) kompoziti nanopartikula GO; b) kompoziti polimera GO.
(modifikovano po Zhao i sar., *Drug Discov Today*, 2017; 22:1302-1317.)

U praktičnom smislu grafen nije samo jedan sloj ugljenikovih atoma u heksagonalnoj kristalnoj rešetki. Struktura se tretira kao 2D sve dok grafen izgrađuje do deset monolejera. Tako se **grafeni sa jednim, sa dva ili sa 3-10 slojeva** mogu posmatrati kao tri različita tipa 2D grafenskih kristala. Deblje strukture sa više od 10 slojeva grafena mogu se smatrati tankim filmovima grafita [Gurunathan i sar., 2016].

Prilikom dobijanja grafena hemijskim ili elektrohemijskim putem, prvi korak je oksidacija i raslojavanje grafita, pri čemu nastaje **grafen-oksidi**. Na ovakav način dobija se monosloj ugljenika sa visokim udjelom kiseonika. Za razliku od grafena, GO, zbog prisutnosti defekata unutar svoje strukture, ima smanjenu električnu provodljivost, ali se odlikuje dobrom rastvorljivošću u vodenom medijumu i stoga nalazi primenu u sensorima i u izradi provodnih polimera. Redukcijom je moguće prevesti GO u grafen [Dreyer i sar., 2010].

Grafenske nanotrake su pojedinačni slojevi grafena koji su sečeni po određenom obrascu – cic-cak (cik-cak nanotrake) ili u vidu stolice (cik-cak i stolične nanotrake), da bi se dobile određene električne osobine. Obe vrste ovako dobijenih nanotraka su poluprovodnici i pokazuju spin-polarizovane ivice. Njihova 2D struktura, visoka električna i termička provodnost i mali šum, čine da su nanotrake moguća alternativa bakru za integrisane veze među kolima. Procesom nanotomije mogu da se proizvedu velike količine nanotraka kontrolisane širine [Stankovich i sar., 2007].

Redukovani GO (rGO) dobija se redukcijom GO uz pomoć različitih hemijskih i bioloških redukcionih agenasa. Kao hemijska redukciona sredstva najviše se koriste hidrazin, Na-botohidrid, Lovesonov (*Lawesson*) reagens i tiourea [Liu i sar., 2011; Gurunathan i Kim, 2016]. Međutim, ovim jednostavnim redukcionim postupcima stvaraju se grafenski filmovi koji sadrže mali odnos C:O i znatnu količinu rezidualnih funkcionalnih grupa koje stvaraju filmove velike rezistencije. Pored toga hemijski redukциони agensi su toksični i eksplozivni. Grafeni dobijeni ovim hemijskim postupkom su ograničene rastvorljivosti, pa čak mogu da podlegnu aglomeraciji u toku pripreme u vodi i većini organskih rastvarača zbog tendencije π - π slaganja slojeva rGO. Najčešće se kao redukciona sredstva koriste anhidrovani hidrazin, hidrazin-monohidrat, natrijum-borohidrid i vodonik-sulfid, koji su svi izuzetno toksični i štetni za žive organizme i okruženje [Eda i Chhowalla, 2010; Gurunathan i Kim, 2016]. Zato se danas traga za novim prirodnim redukcionim agensima, kao što su rasferatrol, ekstrakt iz biljke *Ginkgo biloba* i sl. koji su pogodni za biomedicinsku upotrebu u smislu dobijanja bezopasnih, antikancerskih nanoterapijskih molekula i citokompatibilnih grafena [Gurunathan i sar., 2014; Gurunathan i sar., 2015].

Drugi mogući put iskorišćavanja svojstava grafena u inženjerstvu materijala jeste ugradnja grafenskih slojeva u kompozitne materijale. Proizvodnja takvih materijala zahteva da grafenski slojevi budu homogeno distribuirani u različitim matricama, te da se grafen proizvodi u velikim količinama. Opisani su **različiti kompoziti grafena sa polimerima**, kao što su poli(natrijum 4-stirensulfonat), poli(*N*-vinill-2-pirolidon), poly(alilamin), beta-merkptoentanol, dietiltreitol, i trietilamin [Stankovich i sar., 2006; Tang i sar., 2012; Gurunathan i Kim, 2016]. Grafen može da se meša sa drugim materijalima, npr. prirodnim ili sintetičkim polimerima, a u cilju pojačanja njihovih mehaničkih i električnih karakteristika. On se, takođe, lako **funkcionalizuje** putem

fizičkih interakcija sa bioaktivnim materijama, kao što su proteini, enzimi, lekovi, faktori rasta i DNK [Liu i sar., 2014; Weaver i Cui, 2015].

2.2.3. Sinteza i dobijanje grafena

S obzirom na velike potencijale grafena, naučnici širom sveta počeli su da razvijaju postupke sinteze, pa danas postoji više metoda kojima se može sintetisati ovaj materijal. U početku se smatralo da alternativne metode dobijanja grafena nemaju perspektivu u poređenju sa mikromehaničkim cepanjem. Međutim, danas grafen može da se proizvede i hemijskim postupcima, elektrohemijskim metodama ili rastom slojeva grafena na površinama. Tako npr. epitaksijalnim postupkom sinteze grafen može da se dobije direktno na poluprovodničkim površinama, kao što je SiC, gde se toplotnom razgradnjom površine SiC dobija grafen ili više slojeva grafena. Tehnološki gledano, SiC će, najverovatnije, biti osnova za širu industrijsku primenu grafena.

Sinteza grafena i njegovih derivata može da se klasifikuje u dve kategorije: sinteza od gore prema dole (*top-down*) i sinteza od dole prema gore (*bottom-up*). Prvi način podrazumeva dobijanje grafena eksfolijacijom iz grafitnih materijala sledećim postupcima: mikrohemijskom i elektrohemijskom eksfolijacijom, elektrohemijskom i hemijskom redukcijom, eksfolijacijom GO i eksfolijacijom na bazi rastvarača. Drugi način uključuje: epitaksijalni rast na podlozi od SiO ili SiC, hemijsku depoziciju parom, metodu dobijanje bez supstrata i karbonizaciju [Gurunathan i Kim, 2016]. Mikromehanička eksfolijacija je metoda koja se najviše koristi za ispitivanje fundamentalnih osobina grafena, ali nije pogodna za komercijalnu upotrebu. Elektrohemijska eksfolijacija u sintezi grafena, kod koje se koristi kiselina kao surfaktant, nije idealna za dobijanje grafena prilagođenih za biomedicinsku upotrebu jer se, između ostalog, surfaktant teško otklanja iz finalnog proizvoda. Danas su na raspolaganju i druge metode, kao što su tečna faza eksfolijacije grafita, termalna sinteza, fotokataliza, fotodegradacija i sl. [Su i sar., 2011; Gurunathan i Kim, 2016]. Intenzivno se razvijaju i postupci sinteze grafena upotrebom biomolekula. Upotreba bioloških materijala za sintezu nanočestica privlači veliku pažnju zbog svojih niskih energetske zahteva, ekološke prihvatljivosti, pouzdanosti, ekonomičnosti, stabilnosti i dostupnosti rastvora velike gustine, u poređenju sa hemijskim sintezama. Slični su pristupi iskorišćeni za sintezu grafena pomoću proteina, peptida, bakterija, gljivica, biljaka itd.

Tako se, npr. za „zelenu” redukciju GO koristi bakterijska respiracija [Salas i sar., 2010]. Ovakvi mikrobiološki redukovani grafeni upotrebom različitih bakterija i gljivica, pokazuju odlične elektrohemijske karakteristike. Broj biljnih ekstrakata koji se mogu koristiti u redukciji grafena stalno raste (npr. ekstrakt iz *Gingko biloba*, iz lista višnje, magnolije, platana, bora, javora i sl.) [Lee i Kim, 2014]. Za redukciju GO koriste se i drugi biomolekuli, kao što su askorbinska kiselina, amino-kiseline, glukoza, goveđi serumski albumini, melatonin, humanin, rasferatrol i dr [Gao i sar., 2010; Esfandiar i sar., 2011; Gurunathan i sar., 2013]. Svi ovi biološki postupci zahtevaju kraće vreme za redukciju i, što je najvažnije, materijali dobijeni na ovaj način su netoksični i biokompatibilni [Gurunathan i Kim, 2016].

2.2.4. Primena grafena u industriji

Grafen će zbog svoje velike provodnosti biti izuzetno važna komponenta u integrisanim kolima (npr. kompjuterskim čipovima). U integrisanim kolima on pokazuje veliku pokretljivost električnih naboja i nizak nivo smetnji. Očekuje se da će grafenski tranzistori zameniti silicijumske i omogućiti izradu još efikasnijih računara. Grafenski tranzistor bi, teorijski, mogao da radi ne samo brže, već i na višim temperaturama u odnosu na klasične, silicijumske. To će omogućiti da se reši problem pojačanja snage i smanjenja dimenzije poluprovodnika bez povećavanja njihove temperature. Pošto je grafen elektroprovodan, čvrst i gotovo potpuno providan (apsorbuje samo 2,3% svetlosti), mogućnosti njegove primene su izuzetno velike u kreiranju providnih ekrana osetljivih na dodir i svih *touch screen* uređaja. Grafen se može koristiti i za izradu svetlosnih panela i solarnih ćelija, za detekciju gasova, za desalinizaciju, za destilaciju alkohola, kao i za pravljenje takozvanih grafenskih tranzistora, kvantnih tačaka (*quantum dots*), grafenskih traka, optičkih modulatora, ultrakondenzatora, pizoelektričnih uređaja, uređaja za regulaciju temperature i raznih grafenskih biouređaja [Baruhović, 2014]. Grafen nudi fizičarima mogućnost da proučavaju dvodimenzione materijale sa jedinstvenim svojstvima i zahvaljujući njemu mogući su eksperimenti koji će omogućiti nova saznanja u domenu kvantne fizike [Novoselov i sar., 2004; Geim, 2009]. S obzirom na tako široku potencijalnu primenu, grafen bi mogao da učini mnogo više od onog što su, kad je elektronika menjala svet, učinile legure sa silicijumom. Pomešan sa plastikom, mogao bi da omogući da se izrade lagani i superjaki kompozitni

materijali za sledeću generaciju satelita, aviona i automobila. Tanak list grafena može se koristiti i kao izuzetno osetljiv detektor gasa (na nivou molekula gasa). Utopljen u tanak sloj polimera, grafen menja specifičnu električnu otpornost i signalizira prisustvo gasa u najmanjim količinama. Iako je cela zapremina grafena izložena okolini, grafen nema „visećih” (*dangling*) veza na površini, pa se molekuli gasa ne mogu lako apsorbovati. Osetljivost grafenskih gasnih senzora može se drastično povećati dodavanjem funkcionalnih grupa (npr. prevlačenjem tankim slojem polimera). Izuzetno dobra termička provodljivost grafena ukazuje na velike mogućnosti primene, npr. samo 5% grafena po zapremini može poboljšati osobine rashladnog sredstva za 86%. Postoje i realne mogućnosti izrade kondenzatora velikih kapaciteta, što pruža mogućnosti uskladištenja električne energije. Zbog izuzetno male debljine grafena moguće je proizvesti električne kondenzatore i akumulatore energije daleko manjih dimenzija, a većih kapaciteta, čime se rešava problem upotrebe obnovljivih izvora energije vetra i sunca, tj. onih kod kojih je glavni problem neravnomernost isporuke. Grafen debljine manje od 34 nm (manje od 10 slojeva grafena) može da se ugradi u nanopore za posmatranje i dešifrovanje DNK [Baruhović, 2014].

Nedavno je pokazano novo svojstvo GO da velikom brzinom izvlači radioaktivne nukleotide iz vodenih rastvora, što može da se iskoristi prilikom čišćenja lokaliteta zagađenih radijacijom, kao i prilikom eksploatacije zemnih metala i dobijanja nafte i gasa iz uljnog škriljca [Romanchuk i sar., 2013].

Grafen je već našao neposrednu primenu: u izgradnji najmanjeg tranzistora (tranzistor veličine 1 atoma i širine 10 atoma koji radi u opsegu GHz; IBM, 2008. godine); u integrisanim kolima (prvo integrisano kolo od grafena u funkciji radiomiksera; IBM, 2011. godine); u prozračnim provodnim elektrodama (ekrani na dodir, ekrani sa tečnim kristalima, fotovoltaične ćelije i organske diode koje emituju svetlost sa grafenskim anodama); u membranama od GO nepropusnim za gasove i pare (uključujući i helijum), ali propusnim za vodenu paru, a koje se upotrebljavaju u destilaciji alkoholnih pića; za velike površine pokrivena jeftinim solarnim ćelijama i anodnim elektrodama za fotonaponske ćelije; u detekciji pojedinačnih molekula.

Jedan od razloga zašto grafen nije dobio širu primenu jeste veoma visoka cena proizvodnje. Do 2008. godine bio je jedan od najskupljih materijala, ali mu cena postepeno opada. Tako je cena 1 cm² grafena 2010. godine iznosila 100 evra, a 2014.

godine samo 10 evra. Drugi razlog je što ga je teško dobiti u velikim količinama jednostavnim, tehnološki primenljivim postupcima. Među postupcima za dobijanje izdvajaju se epitaksijalni rast grafenskih slojeva na metalnim karbidima (naročito na SiC) sublimacijom, kao i direktno deponovanje iz pare na metalima. U slučaju metalnih podloga sa izolatorskim slojem, razrađene su nove metode prenošenja sa podloge sa izolatorskim slojem, što je olakšalo tehnološki postupak [Baruhović, 2014].

Zbog ekstremno velikih potencijala koje pruža grafen kao „materijal budućnosti”, Evropska komisija je, u okviru programa *Podrške tehnologijama budućnosti – FET (Future and Emerging Technology)*, dodelila milijardu evra za projekat o grafenu (*Grafen Flagship Projects*), prvi projekat u okviru ovog programa. Tako je, uz projekat mapiranja ljudskog mozga pod nazivom *Human Brain Project*, projekat o grafenu dobio najveću sumu koju je Evropska komisija ikad dodelila za jedan naučno-tehnološki projekat. Evropski lideri smatraju da će ovaj projekat, pod rukovodstvom švedskog naučnika Jari Kinaret (*Chalmers University of Technology, Gothenburg, Švedska*), za deset godina dovesti do nove tehnološke revolucije, ali verovatno i snažno uticati na život ljudi i geopolitičke prilike u svetu. Projekat je finansiran za period 2013 – 2022. godine. U okviru njega okupljeno je 150 istraživačkih grupa iz akademskih zajednica i industrijskih kompanija iz 23 evropske države, sa 136 vodećih istraživača, među kojima su i četvoro nobelovaca. Osim toga, projekat ima sve veći broj pridruženih članova koji će biti uključeni u naučne i tehnološke radne pakete iz faze *Horizon 2020* (1. april 2016–31. mart 2018.) (www.graphene-flagship.eu/project). Grafen je, i bez ove investicije, jedna od najvećih naučnih tema u poslednjih deset godina, kako među fizičarima, tako i među istraživačima iz drugih oblasti nauke.

2.2.5. Primena grafena u biomedicini

Tokom istraživanja najviše pažnje je privukao grafen u oksidisanom stanju, GO [Hummers i Offeman, 1958], koga karakteriše velika gustina karboksilnih kiselina, alkohola i funkcionalnih epoksidnih grupa [Dreyer i sar., 2010]. Iako oksidacija u određenoj meri narušava elektronska [Shin i sar., 2009.] i mehanička [Suk i sar., 2010] svojstva grafena, ona utiče na bolju rastvorljivost u vodi i, stvaranjem hemijskih veza, omogućava kovalentnu modifikaciju [Collins i sar., 2011; Sydlík i Swager, 2013]. S

obzirom da oksidacija poboljšava kompatibilnost grafena, zbog sloja vode koji je povezan sa hidrofilnim funkcionalnim grupama, postoji generalno mišljenje da je grafen u oksidiranom obliku najbolji za biomedicinsku primenu [Chapman i sar., 2000; Dreyer i sar., 2010]. Grafen oksid se danas upotrebljava za pripremu kompozitnih biomaterijala [Fan i sar., 2010], u fototermalnim terapijama karcinoma [Zhang i sar., 2011; Yang i sar., 2012], kao nosač za lekove [Sun i sar., 2008; Zhang i sar., 2010] i supstrat za ćelijsku podlogu u tkivnom inženjerstvu [Chen i sar., 2012; Nayak i sar., 2011].

Grafen se primenjuje u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini kod kardiovaskularnog sistema, nervnog tkiva, koštanog tkiva, hrskavice, skeletnog mišićnog tkiva, masnog tkiva, kože i zubnih tkiva [Shin i sar., 2016 a, b; Shin i sar., 2017; Guazzo i sar., 2018].

Grafen u tkivnom inženjerstvu i regeneraciji srčanog tkiva

Poznato je da mezenhimalne matične ćelije srca (MSCs) mogu da poprave perfuziju miokarda i kontraktilnu sposobnost u oštećenom miokardu, tako što se diferenciraju u kardiomiocyte ili ćelije zida krvnog suda. One sekretuju citoprotektivne faktore koji podstiču preživljavanje miocita i smanjuju inflamatorni odgovor. Na MSCs srca značajni uticaj imaju biofizički i biohemijski faktori okruženja. Pokazano je da grafen i njegovi derivati utiču na MSCs srca u uslovima *in vivo*, tako što regulišu diferencijaciju ovih ćelija u kardiomiocyte putem ekspresije proteina ECM i molekula ćelijske signalizacije, kao i putem povećanja električne provodljivosti ECM [Park i sar., 2014]. Takođe, ukoliko se MSCs koimplantiraju sa pahuljama GO, one *in vivo* štite ćelije srca od reaktivnih kiseoničnih radikala [Park i sar., 2015].

Grafen može da se inkorporiše u nosače od hidrogelova, da bi popravio njihove mehaničke karakteristike i električnu provodljivost. Jedan od takvih je GO/želatin-metakriloil (GelMA) hibridni hidrogel. Ukoliko se na onaj 3D tkivni konstrukt u vidu filma, inkorporišu zajedno hMSCs, kardiomiociti i endotelne ćelije, pokazano je da dolazi do popravljavanja maturacije kardiomiocita, kao i intercelularnog električnog kuplovanja i bolje ćelijske organizacije u srčanom mišiću [Shin i sar., 2014]. U drugoj studiji je pokazano da ukoliko se GO doda metakriloil-rekombinovani humani tropoelastin (MeTro), koji je konstruisan tkivnim inženjerstvom kao elastični i električno provodni biomaterijal, GO popravља elastični modul konstrukta za 53%, a

takav konstrukt pokazuje značajnu rezistentnost na rotacioni stress, bez značajne deformacije [Annabi i sar., 2016].

Grafen u tkivnom inženjerstvu i regeneraciji nervnog tkiva

Istraživanja su pokazala da GO promoviše diferencijaciju mišjih embrionalnih matičnih ćelija (mESCs) u dopaminergičke neurone, i to dva puta jače od grafena [Yang i sar., 2014]. Ukoliko se MSCs kultivišu na supstratu od funkcionalizovanih fluorisanih grafena, doći će do njihove neuralne diferencijacije [Lutolf i Hubbell, 2005]. Pojavile su se i prve publikacije o delovanju grafena na humane neuralne matične ćelije (hNSCs). Ukoliko se ove ćelije kultivišu u medijumu sa 2D grafenskim filmom, doći će do njihove brze proliferacije i diferencijacije u neurone, čak i u odsustvu faktora rasta [Park i sar., 2011]. U prisustvu polikarpolakrona obloženih GO dolazi do diferencijacije MSCs u oligodendrocite [Sher i sar., 2008]. Uobličeni jednoslojni grafenski supstrat promoviše rast neurita i stvaranje neuronske mreže [Lorenzoni i sar., 2013], a silikonske nanopartikule u vidu monolejera obložene GO podstiču diferencijaciju hNSCs i rast aksona [Solanki i sar., 2013]. Dokazana je i neuralna diferencijacija MSCs masnog tkiva u neurone, ukoliko se ove ćelije kultivišu na mrežicama od GO, što ukazuje na tranziciju mezoderma u ektoderm [Anghileri i sar., 2008].

Pored pozitivnog uticaja na proliferativni potencijal i diferencijaciju MSCs i NSCs u neurone i oligodendrocite, kao i na podsticanje rasta neurita i aksona, grafen zbog svojih izvanrednih električnih karakteristika može da se koristi i za podsticanje prenosa nervnog signala ili stimulaciju nervne aktivnosti. Pokazano je da elektrode od grafena podstiču rast funkcionalnih neuronskih krugova i da pojačavaju aktivnost nervne mreže [Tang i sar., 2013]. Neuroni posađeni na meka grafenska vlakna pokazuju bolju arborizaciju dendritskog stabla i brži rast, a ukoliko se dodatno deluje električnom stimulacijom, stopa rasta neurona se povećava dva puta. U ovakvim uslovima dolazi do indukcije ulaska u ćeliju Ca^{2+} , koji aktivira signalni put kalmodulin-kinaze, što dovodi do efekta depolarizacije voltažno-zavisnih Ca^{2+} -kanala, koji su aktivirani grafenskim nanovlaknima, pa se tako povećava koncentracija intracelularnog Ca^{2+} i pojačava aktivnost neurona [Feng i sar., 2015].

Konačno, u regeneraciji oštećenih nerava na eksperimentalnim modelima korišćeni su različiti 2D i 3D grafenski konstrukti. Upotreba takvih konstrukata od 3D grafenskog filma, nanetog na katalitičku elektrodu metodom hemijske depozicije,

pokazala je stimulaciju rasta neurita u oštećenom perifernom nervu i odličnu biokompatibilnost [Hong i sar., 2014]. Ukoliko se pomešaju grafen i polilaktid-koglikolidi (PLC) kao biolink, a potom se izradi nervna cev postupkom 3D štampanja, dolazi do povećanja elasticiteta i provodljivosti ovakvog konstrukta. Takav konstrukt indukuje neuralnu diferencijaciju hMSCs u prostom medijumu za rast, bez neurogenih faktora rasta [Jakus i sar., 2015].

Grafen u tkivnom inženjerstvu i regeneraciji koštanog tkiva

Što se tiče koštanog tkiva, materijali izgrađeni na bazi grafena našli su široku primenu, bilo kao samostalni materijali za primenu ili inkorporisani u koštane implantate i skafolde (nosače) [Park i sar., 2015].

Smatra se da materijali na bazi grafena, svojom odličnom mehaničkom čvrstoćom i apsorpcijom belančevina, mogu da poboljšaju osteogenu diferencijaciju hMSCs [Shi i sar., 2012; Venkatesan i sar., 2014], čak i bez dodavanja faktora rasta kostiju, kao što je koštani morfogeni protein-2 (BMP-2) [Akhavan i sar., 2013]. Veruje se da je to posledica povećanja lokalne koncentracije deksametazona u grafenskoj baznoj ravni preko π - π interakcije, koja može da pojača osteogenu diferencijaciju [Lee i sar., 2011; Akhavan i sar., 2013].

Ugrađivanje grafena i njegovih hemijskih derivata u materijale koji se koriste za regeneraciju kostiju može da poveća osteokonduktivnost, stimuliranjem biomineralizacije i osteogene diferencijacije. Tako je pokazano da biomaterijali izgrađeni od CaCO_3 ploča od grafena i GO mogu da povećaju biomineralizaciju. Istraživanja su, takođe, pokazala da u *in vitro* uslovima hibridni kompoziti GO/ CaCO_3 ili grafen/ CaCO_3 mogu da poboljšaju formiranje hidroksiapatita, kada se inkubiraju u simulisanom rastvoru telesne tečnosti [Kim i sar., 2011]. Zbog grube površinske morfologije i izvrsnih mehaničkih svojstava, hidrogelovi na bazi grafena indukuju regeneraciju kostiju kod eksperimentalnih životinja tako što podstiču osteogenu diferencijaciju MSCs [Lu i sar., 2013].

Da bi se poboljšala biomimetična mineralizacija na GO, površina GO može da se modifikuje sa različitim funkcionalnim grupama, npr. sa sulfatnim grupama, kako bi se stimulisalo vezivanje Ca^{2+} i time formirala jezgra nukleacije za mineralizaciju HAP [Liu i sar., 2014]. Tako se npr. karagenan, prirodni polisaharid koji se sastoji od visoko

sulfatiranih jedinica, koristi uspešno za funkcionalizaciju površine grafena i indukciju mineralizacije HAP.

Grafen može pojačati mehanička svojstva hibridnih materijala koji se koriste u regeneraciji koštanog tkiva kod koga je potrebno veliko opterećenje [Shin i sar., 2016].

Grafen u tkivnom inženjerstvu i regeneraciji hrskavice

Ćelijske terapije pomoću MSCs našle su široku kliničku primenu u regeneraciji hrskavice zahvaljujući činjenici da indukuju hondrogenu diferencijaciju kod oštećenog tkiva. Grafen se u takvim terapijama ugrađuje kao nosač za matične ćelije zahvaljujući njegovom stimulatornom dejstvu na ćelijski rast i diferencijaciju i izvrsnim mehaničkim svojstvima [Shin i sar., 2016].

Pokazano je da se rastvor na bazi grafena u fetalnom goveđem serumu sa induktorima hondrogene diferencijacije i dodatim hMSCs, samostalno „sklapa” u biokompozit [Lee i sar., 2015]. Takav grafenski biokompozit sa MSCs poboljšava preživljavanje ćelija i njihovu hondrogenu diferencijaciju, tako što se talože komponente ekstracelularnog matriksa koje su specifične za sekretornu aktivnost hondrocita (agrekana, kolagen-2 i glikozaminoglikani). Pre umetanja u ćelijske kuglice, listovi GO mogu da se oblože fibronektinom i proteinima familije TGF- β putem π - π i elektrostatskih interakcija, čime bi se očuvala njihova proteinska struktura i omogućio jači uticaj na hondrogenu diferencijaciju [Yoon i sar., 2014].

Materijali na bazi grafena deluju kao mehanički i električni signali u hondrogenim nosačima, s obzirom da mogu da poboljšaju ukupnu mehaničku čvrstoću i provodnost. Pokazana je biokompatibilnost 3D nosača izgrađenog od hibrida koji se sastoji od GO, hondroitin-sulfat-metakriloila (CSMC) i poli(etilen glikol) metiletar- ϵ -kaprolakton-akrilol-hlorida (PECA). Ćelije hrskavice uzgojene na ovom biomimetskom 3D nosaču (CSMA / PECA / GO) proliferisane su *in vitro*, uz visoki stepen vijabilnosti, što ukazuje na biokompatibilnost nosača. Izveden je i eksperiment *in vivo*, u kome je kunićima sa osteohondralnim defektom ugrađen 3D nosač CSMA / PECA / GO, uz injekciju hondrogenih ćelija. On je, u poređenju sa grupom životinja kojoj su implantirani samo 3D nosači, rezultirao većim volumenom novoformiranog hrskavičnog i koštanog tkiva [Liao i sar., 2015].

Grafen u tkivnom inženjerstvu i regeneraciji skeletnog mišićnog tkiva

Poznato je da skeletno mišićno tkivo, nakon jakih povreda i oštećenja, ima ograničenu sposobnost regeneracije, što može da dovede do njegovog trajnog gubitka ili do gubitka funkcije mišića. Za regeneraciju mišićnog tkiva mogu se, takođe, koristiti skafoldi od nanomaterijala koji deluju kao funkcionalni nosači za matične ćelije, s obzirom da je dokazano da podstiču proliferaciju i diferencijaciju ovih ćelija i njihovu samoobnovu [*Shin i sar., 2016*].

Budući da materijali na bazi grafena poseduju izvrsnu fleksibilnost, relativno visoku električnu provodljivost (0,6 s/m) i jaka mehanička svojstva s ekstremno malom gustinom (0,16 mg/cm³), oni su se pokazali kao odlični ćelijski supstrati u tkivnom inženjerstvu mišićnog tkiva [*Lu i sar., 2013*].

Materijali na bazi grafena mogu poboljšati adheziju, proliferaciju i miogenezu ćelija skeletnih mišića [*Ahadian i sar., 2014*], kao i njihovu kontraktilnu snagu, putem „poravnavanja” miofibrila i samih skeletnih miocita [*Bajaj i sar., 2014; Mu i sar., 2015*].

Grafen u tkivnom inženjerstvu i regeneraciji masnog tkiva i kože

U tkivnom inženjerstvu kože, koje ima za cilj poboljšanje tkivne regeneracije, istraživači moraju da prevaziđu mnogobrojne probleme vezane za strukturu same rane, kao i za sekreciju i formiranje ECM. Za regeneraciju kože poželjno je koristiti materijale sa mikropotoznom strukturom i visokim odnosom površine i volumena, koji su slični ECM kože. Grafeni i GO su, zbog svoje velike površine i osobine da mogu da apsorbuju proteine, preporučeni kao pogodni materijali za izradu kožnih implantata. Istraživači su pokazali da hibridni vlaknasti listovi od GO, poli (mlečne-ko-glikolne) kiseline (PLGA) i kolagena visoke hidrofilitnosti i površinske energije, mogu da podstaknu adheziju humanih fibroblasta dermisa. Kolagen iz ovog hibrida omogućava biohemijску interakciju sa dermalnim fibroblastima, koja može da se uporedi sa interakcijom integrin-ECM. To dovodi do zaključka da GO i kolagen mogu da podstaknu regeneraciju kože usled njihovog kombinovanog povoljnog uticaja na proliferaciju i migraciju dermalnih fibroblasta. Ćelije koje su uzgajane na GO-PLGA / kolagenskim pločama rasle su na sličan način kao ćelije na PLGA / kolagenskim pločama, ali su imale povećanu proliferativnu aktivnost [*Lee i sar., 2014*].

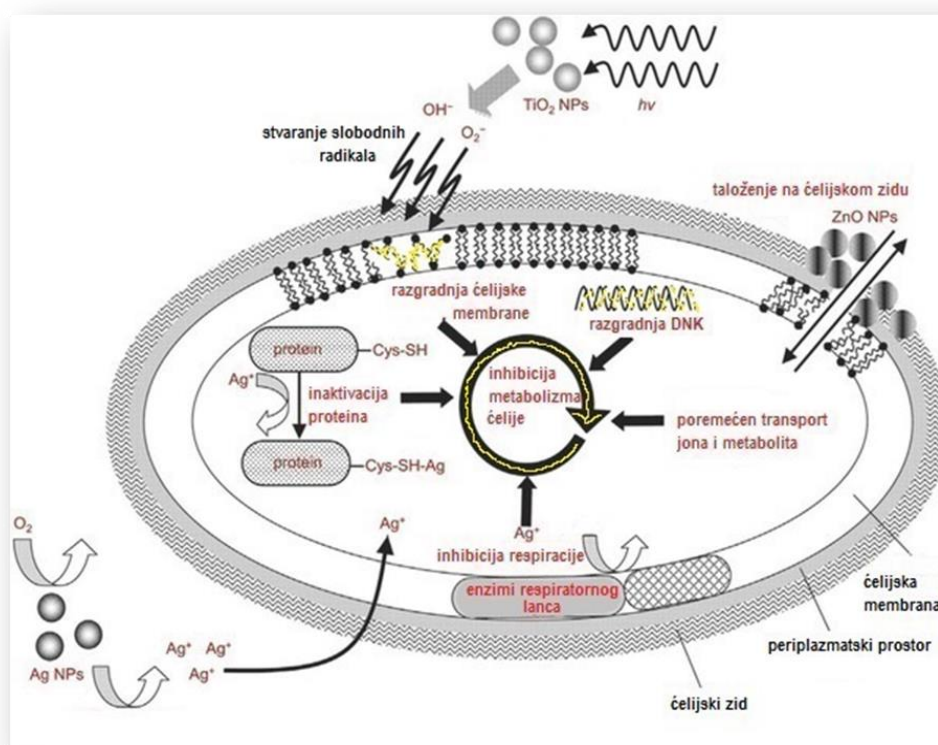
2.3. SREBRO

Baktericidna svojstva srebra poznavali su i koristili u medicinske svrhe još Feničani, Egipćani i Grci. Monovalentno srebro, kao što su srebro-nitrat i srebro-sulfadiazin, poseduju oligodinamski efekat i zbog toga su poznati po svojoj antibakterijskoj aktivnosti. Široka upotreba antibiotika dovela je do sve veće bakterijske rezistencije, zbog čega se javila potreba za antibakterijskim agensima koji u svojoj osnovi imaju srebro. Lokalna upotreba ovih agenasa je pokazala odličnu inhibiciju rasta bakterija, ali proces zarastanja rana je nešto sporiji. Kako bi se rešio ovaj problem srebro je počelo da se koristi u obliku koloidne suspenzije, odnosno u obliku nanočestica (nanopartikula) srebra (AgNPs).

Sa pojavom nanotehnologije upotreba srebra u medicinske svrhe doživljava novi procvat, budući da izuzetno velika specifična površina AgNPs omogućava bolji kontakt sa mikroorganizmima i efikasnije delovanje [Li i sar.,2017]. Kao antimikrobne materije AgNPs imaju širok raspon primena, od dezinfekcije medicinskih sredstava (npr. koštani cement, hirurške maske i implantabilni uređaji) i kućnih aparata do tretiranja vode. Koriste se u lečenju teških opekotina i teških hroničnih rana, u sastavu različitih obloga, kao nosači lekova i slično. Odlična baktericidna aktivnost se dovodi u vezu sa poboljšanom reaktivnom površinom nanočestica srebra. One imaju sposobnost da inaktiviraju vitalne enzime bakterija, kao i da sprečavaju replikaciju bakterijske DNK. Takođe, AgNPs destabilizuju potencijal plazma membrane, čime se smanjuje nivo intracelularnog adenzin-trifosfata (ATP), a to posledično dovodi do smrti bakterijske ćelije [Varaprasad i sar., 2009].

Nanočestice srebra imaju antimikrobno dejstvo protiv niza infektivnih mikroorganizama, uključujući *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Syphilis typhus* i *Staphylococcus aureus*. Pokazano je da AgNPs, uglavnom u rasponu dijametra od 1 do 10 nm, pričvršćene na površinu membrane *E. coli* oštećuju disanje i propustljivost ovih mikroorganizama. Uočeno je da AgNPs imaju veći antibakterijski učinak na *B. subtilis* nego na *E. coli*, što upućuje na njihovo selektivno antimikrobno dejstvo, eventualno povezano sa strukturom bakterijske membrane. Zabeležena je sinergijska aktivnost AgNPs i nekih antibiotika (eritromicin, amoksicilin, penicilin G, klindamicin i vankomicin) protiv *E. coli* i *S. aureus*.

Antimikrobna svojstva AgNPs (sl. 2.3) povezana su sa: 1) sposobnošću da snažno reaguju sa tiolnom grupom jedinjenja, koja se nalaze u respiratornim enzimima bakterijskih ćelija; 2) nekuplovanjem oksidativne fosforilacije u bakterijskoj ćeliji; 3) indukcijom ćelijske smrti bakterije putem indukcije oslobađanja slobodnih kiseoničnih radikala; 4) interferencom sa respiratornim lancem na nivou citohroma C i komponentama transportnog sistema elektrona u bakterijskoj ćeliji; 5) interakcijom sa sulfuronskim grupama u membranama bakterija, čime se oštećuje bakterijski omotač; 6) interakcijom sa fosfornim grupama u DNK, čime se oštećuje hromozomski materijal jedra. Rezultat toga je da su AgNPs efikasna antiseptička sredstva za kontrolu mikroorganizama širokog spektra i bakterija otpornih na antibiotike, pa se njihovom upotrebom značajno smanjuje mogućnost bakterijske rezistencije na antibiotike [Korbekandi i Iravani, 2012; Moritz i Geszke-Moritz, 2013; Dakal i sar., 2016].



Slika 2.3. Antibakterijsko dejstvo nanopartikula metala i oksida metala, uključujući AgNPs (modifikovano po Moritz i Geszke-Moritz, 2013 i Li i sar., 2018)

Što se tiče medicinskih uređaja, svakako je najšira primena AgNPs za oblaganje plastičnih katetera namenjenih upotrebi u urologiji i hirurgiji, kako bi se smanjio rizik

od zaraznih komplikacija sa *E. coli*, *Enterococcus*, *S. aureus*, *Candida albicans* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Srebrne nanočestice inkorporisane u glinu pokazale su značajno antimikrobno dejstvo protiv kožnih patogena, uključujući *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *Streptococcus pyogenes*, kao i protiv *S. aureus* koji je otporan na meticilin i oksacilin.

Uglavnom je nepoznato dejstvo AgNPs protiv gljivičnih patogena. Međutim, zabeleženo je značajno antifungalno dejstvo na *Trichophyton mentagrophytes* i razne vrste *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*). Smatra se da AgNPs menjaju normalnu strukturu gljivične ovojnice i dovode do njenog značajnog oštećenja.

Nanočestice srebra (5-20 nm) imaju citoprotektivno dejstvo u ćelijama inficiranim virusom HIV-1 (Hut / CCR5 ćelije), s obzirom da inhibiraju replikaciju virusa uzrokujući apoptozu inficiranih ćelija. Osim toga, ove čestice pokazuju direktnu antivirusnu aktivnost (isključivo unutar raspona 1-10 nm) protiv HIV-1 virusa. One se prvenstveno vezuju za gp120 podjedinicu glikoproteina virusnog omotača, a ova interakcija uzrokuje da se virus ne može vezati za ćelije domaćina.

Smatra se da su, uvođenjem nanopartikula srebra i prevlaka grafena u kompozitne hidrogelove na bazi PVA, dobijeni novi materijal, sa odličnim biološkim, fizičko-hemijskim i termalnim karakteristikama koje ih preporučuju kao nove, delotvorne materijale prilikom tretiranja rana i opekotina [Abudabbus i sar., 2016; 2018].

Ipak, ne treba zaboraviti na potencijalna toksična dejstva AgNPs na cirkulatorni, respiratorni, centralni nervni sistem, jetru i kožu [Stensberg i sar., 2011].

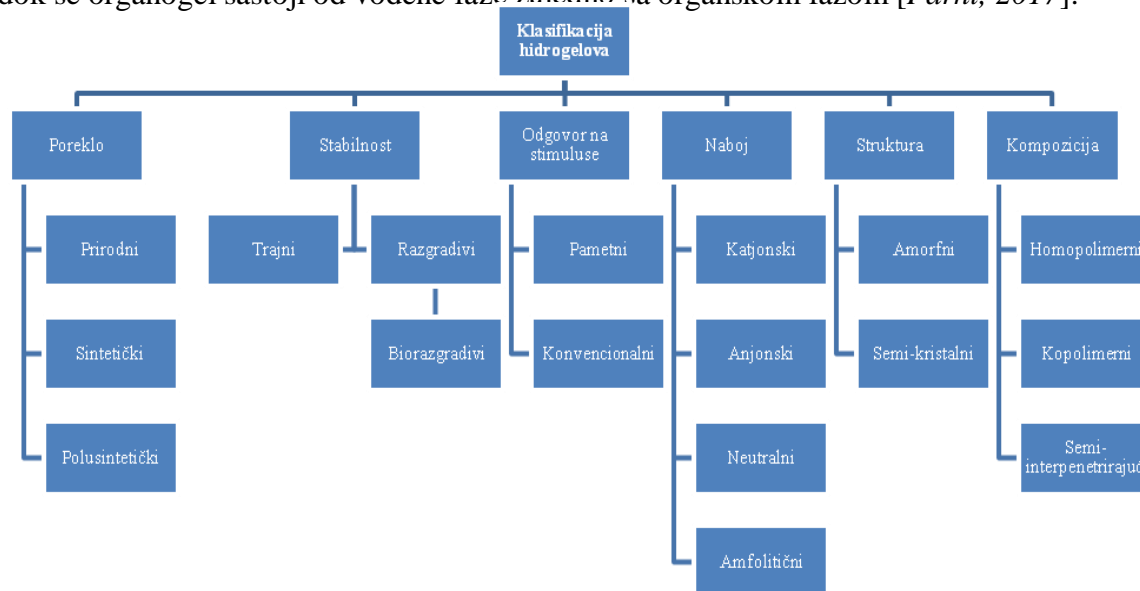
2.4. HIDROGELOVI

Hidrogelovi predstavljaju trodimenzionalne mreže hidrofilnih polimera koji su povezani kovalentnim vezama ili se drže zajedno pomoću fizičkih intra- i intermolekularnih sila privlačenja. Oni imaju sposobnost apsorpcije velike količine vode ili tkivne tečnosti, čak i do nekoliko hiljada procenata, tako da veoma lako bubre, a ne rastvaraju se. Ta visoka hidrofilnost je, pre svega, posledica prisustva hidrofilnih grupa kao što su karboksilne, amidne, amino- i hidroksilne grupe raspoređene duž polimernih lanaca. U nabubrelom stanju hidrogelovi su mekane i gumaste konzistencije, slično

prirodnim tkivima. Upravo zbog toga mnogi hidrogelovi, kao na primer hitozan i hidrogelovi na bazi alginata, pokazuju visok stepen biokompatibilnosti [Kyung i sar., 2002; Perale i sar., 2012; Akhtar i sar., 2016].

2.4.1. Hidrogelovi u poređenju sa gelovima

Danas su ranija gledišta u poimanju pojmova gelova i hidrogelova unekoliko korigovana [Parhi, 2017]. Gel je transparentna, polučvrsta formulacija čiji se satav karakteriše visokim odnosom rastvarača prema materiji koja se gelira. U njoj se nalazi manje od 15% gelirajuće materije, tako da u gelu praktično dominira velika količina tečnosti u kojoj su raspršene manje količine čvrste (gelirajuće) materije [Gehrke i Lee, 1990]. Prema USP (*Unique Selling Proposition*) gelovi se definišu kao polučvrsta suspenzija malih anorganskih čestica ili velikih organskih molekula, koja je prožeta tečnošću. Tečna faza je ograničena u rigidnu trodimenzionalnu polimernu mrežu, pa zato gel pokazuje viskozno-elastičnu prirodu. Gelovi se mogu klasifikovati u *hidrogelove* i *organogelove* (klasične gelove ili gelove u užem smislu reči), na osnovu tečnog medijuma koji je zatvoren unutar polimerne mreže. Hidrogel se sastoji od vodene faze, dok se organogel sastoji od vodene faze zajedno sa organskom fazom [Parhi, 2017].



Slika 2.4. Klasifikacija hidrogelova

Hidrogelovi su hidrofilni, trodimenzionalni, poprečno povezani polimerni sistemi sposobni za upijanje velike količine vode ili bioloških tečnosti između svojih

polimernih lanaca, pa se tako formira vodena polučvrsta / čvrsta gel-mreža. Polimerne mreže u hidrogelu mogu da apsorbuju vodu od 10 do 20%, pa sve do hiljadu puta u odnosu na njihovu suhu masu. Na nekoliko glavnih karakteristika hidrogelova zasniva se njihova primena u farmaceutskoj industriji. Pod jedan, po svom sastavu i mehaničkim osobinama hidrogelovi su slični prirodnim ECM, pa se na osnovi ove karakteristike bazira njihova primena kao nosača za ćelije tokom regeneracije tkiva ili nosača u isporuci lekova. Pod dva, imaju meku konzistenciju koja podstiče unos vode i time stvaranje hidratizane čvrste materije, vrlo slične ćelijama u telu. Pod tri, elastična svojstva (zbog prisustva ukrštenih mreža polimera) potpuno nabubrelih ili hidratizanih hidrogelova smanjuju se iritacijom okolnih tkiva nakon implantacije [Parhi, 2017].

2.4.2. Klasifikacija hidrogelova

Postoje brojne klasifikacije hidrogelova, a jedna od njih je prikazana na sl. 2.4.

Podela u odnosu na poreklo

Hidrogelovi se, u odnosu na poreklo, mogu klasifikovati kao *prirodni*, *sintetički* i *polusintetički*, a danas se, kao posebna kategorija, izdvajaju i patentirani hidrogelovi [Perale i sar., 2012; Parhi, 2017].

Prirodni hidrogelovi potiču od prirodnih polimera, kao što su različiti polisaharidi (agaroza, alginati, celuloza, hitozan, hijaluronska kiselina, kseroglukan, ksiloglukan i dr.), polipeptidi (npr. kolagen), vezani proteini (npr. fibrin), hidrolizovani kolagen (npr. želatin), polinukleotidi i sl. U prirodne hidrogelove spada i komercijalni *Matrigel* koga izgrađuju laminin, kolagen IV i heparin. Svi ovi polimeri dobijaju se iz različitih prirodnih izvora (npr. kolagen se ekstrahuje iz tkiva sisara, a hitozan iz egzoskeleta školjki). Hidrogelovi bazirani na prirodnim polimerima široko se primenjuju u tkivnom inženjerstvu zbog posedovanja određenih svojstava, kao što je prezentacija receptor-vezujućeg liganda koja olakšava biološko prepoznavanje i osetljivost na proteolitičko remodelovanje i degradaciju. Međutim, upotreba prirodnih hidrogelova pokazala je i neke nedostatke, kao što su problem imunogenosti, prenos patogena i složenost prilikom prečišćavanja [Perale i sar., 2012; Akhtar i sar., 2016].

Sintetički hidrogelovi su prvi materijali koji su se koristili kao skafoldi u tkivnom inženjerstvu. Većina sintetičkih hidrogelova nastala je polimerizacijom vinila ili vinil-aktiviranog monomera. Od stepena hidrofilitnosti ovih monomera i gustine

njihovog ukrštanja zavisi i stepen bubrenja sintetičkih hidrogelova. Prilikom sinteze sintetičkih hidrogelova obično se dodaje bifunkcionalni monomer, koji je odgovoran za *in situ* unakrsno povezivanje monomernih lanaca. Broj novosintetisanih hidrogelova se stalno povećava. Među sintetičkim hidrogelovima, koji su našli primenu kao skafoldi u regeneraciji oštećenja kičmene moždine, nalaze se poliestri (poli- ϵ -karpolakton, poli(hidroksimetil-metakrilat), poli(hidroksipropil-metakrilat), acetati (polivinil alkohol), polietri [poli(etilen-glikol)], oligopeptidi (*Putamatrix*), akrilati (poliakrilamidi), ko- polipeptidi (lizin-leucin), kopolimeri [poli(N-izopropilakrilamid)-ko-polivinil- piroolidon], razgranata poliakrilna kiselina (*Carbapol*) i dr. Kada se koriste hidrogelovi bazirani na sintetičkim analozima, postiže se značajno veća kontrola nad tkivnim odgovorom i karakteristikama materijala, čime se, između ostalog, sprečavaju imunogenost i prenos patogena [*Perale i sar., 2012; Akhtar i sar., 2016*].

Polusintetički (kompozitni prirodni-sintetički) hidrogelovi nastali su kao realizacija ideje da se prirodni makromolekuli, kao što su fibronektin, laminin ili agaroz, oblože sintetičkim polimerima da bi se podstakla ćelijska adhezija i vijabilnost. Oni nastaju tzv. blok-polimerizacijom između sintetskih i prirodnih makromolekula ili povezivanjem polimera putem fizičkih interakcija. Cilj sinteze ovakvih kompozitnih hidrogelova je da se kombinuju i objedine biokompatibilnost prirodnih hidrogelova sa mehaničkim i fizičkim karakteristikama sintetičkih hidrogelova. Tako se npr. adhezivne karakteristike povećavaju ukoliko se polilizin doda u polietilen-glikol (PEG) ili hitozan u metakrolamid, a povećanje ćelijske vijabilnosti i biokompatibilnosti postignuto je kopolimerima agaroz-*Carbapol* ili hijaluronan-PEG [*Perale i sar., 2012*].

Danas se u svetu blizu 80% naučnih i tehnoloških saznanja dokumentuje preko patentne licence i ne publikuje se na drugačiji način. Prvi patentirani hidrogel nastao je 1966. godine, a do danas je patentirano više od 4000 hidrogelova (podaci *QPat*), među kojima se nalaze npr. 44 patentirana hidrogela namenjena regeneraciji oštećenja kičmene moždine. Među patentima najveći broj su polusintetički hidrogelovi (71,5%), na prirodne otpada 19%, a na sintetičke 9,5%. Stoga nije iznenađujuće što su polisintetički hidrogelovi izdvojeni kao posebna kategorija [*Perale i sar., 2012*].

Podela u zavisnosti od stepena izdržljivosti hidrogela

U zavisnosti od stepena stabilnosti u fiziološkom okruženju hidrogelovi mogu biti *trajni* (većina hidrogelova na bazi poliakrilata) ili *biorazgradivi* (hidrogelovi

bazirani na polisaharidima). Danas se biorazgradivi hidrogelovi primenjuju u mnogim oblastima, kako u biomedicini, tako i u industriji. Razgradnja polimera unutar matriksa hidrogela odvija se putem lančanih reakcija iz kojih se, na kraju, dobijaju oligomeri male molekulske težine. Zatim se dobijeni oligomerni lanci ili odmah eliminišu iz tela ili podležu daljim procesima degradacije [Zhu i Ding, 2006].

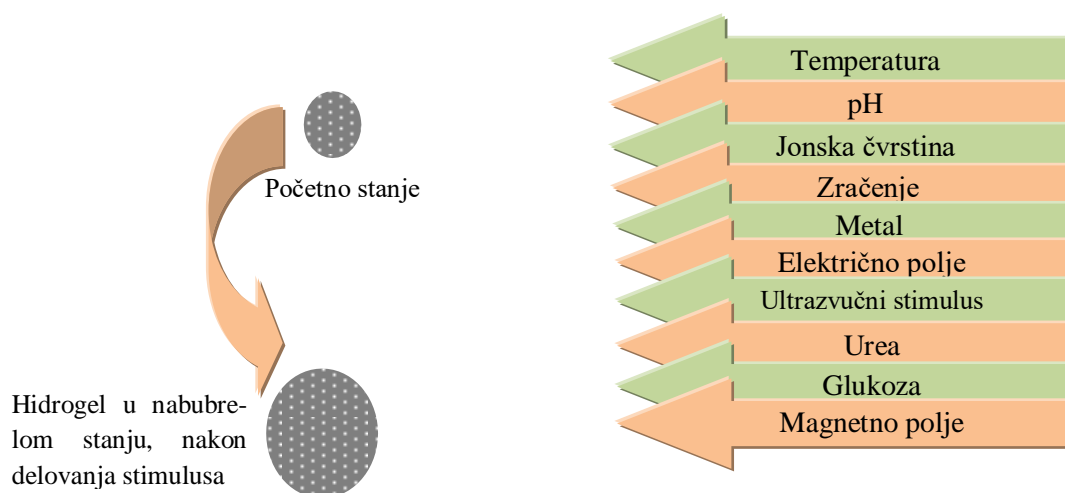
Podela u odnosu na druge kriterijume

Hidrogelovi se, u odnosu na elektronski naboj, dele na *anjonske, katjonske, neutralne i amfolitične*. U odnosu na strukturu mogu biti *amorfn i semikristalni*, a u odnosu na kompoziciju *monopolimerni, ko-polimerni i seminterpenetrirajuće mreže*. Međutim, najvažnija podela u pogledu polimera namenjenih farmaceutskoj industriji jeste podela na: *fizičke ili reverzibilne hidrogelove i hemijske ili permanentne hidrogelove*.

U pripremi fizičkih hidrogelova ključna je selekcija polimera i ona zavisi od dva glavna kriterijuma: 1) interakcija između lanaca mora biti dovoljno jaka da se formiraju semi-permanentne veze u molekularnoj mreži i 2) mreža u sebi mora da zadrži veliku količinu vode. Veze koje se kod fizičkih gelova formiraju između polimernih lanaca su hidrofobne, elektrostatičke i vodonične. Pošto se radi o slabim fizičkim vezama, ovi hidrogelovi su reverzibilni i pogodni su za inkorporaciju bioaktivnih supstanci. Međutim, oni su nefleksibilni prema varijablama kao što su vreme geliranja, veličina pora, hemijska funkcionalizacija i degradacija ili otapanje (sl. 2.5), što dovodi do nedoslednosti u njihovom ponašanju u *in vivo* uslovima [Aghtar i sar., 2016; Parhi, 2017].

Hemijski hidrogelovi mogu da nastanu kovalentnim unakrsnim povezivanjem polimernih lanaca ili njihovim interpenetrirajućim umrežavanjem. U prvom načinu, unakrsno povezivanje postiže se dodavanjem malih veznih molekula, konjugacijom polimer-polimer, fotosenzibilnim agensima ili reakcijama uz pomoć enzimatske katalize. Interpenetrirajuće mreže se definišu kao materijali koji sadrže dva ili više polimera u formiranoj mreži, pri čemu se jedan polimer unakrsno vezuje u prisustvu drugog. U odnosu na metodu hemijske pripreme mogu biti simultani i sekvencijalni. Hemijski hidrogelovi su veoma stabilni na degradaciju i fleksibilni su u odnosu na vreme želiranja, veličinu pora hidrogela, hemijsku funkcionalizaciju i degradaciju ili rastvaranje. Njihove mehaničke karakteristike su veće u odnosu na fizičke hidrogelove i

veoma su stabilni na degradaciju. Unakrsno povezani hidrogelovi dopuštaju apsorpciju vode i bioaktivnih spojeva bez otapanja, kao i otpuštanje leka difuzijom, pa su našli široku primenu u farmaceutskoj industriji, poljoprivredi, prehrambenoj industriji, kozmetologiji i sl. [Aghtar i sar., 2016; Parhi i sar., 2017].



Slika 2.5. Stimulusi koji mogu da utiču na svojstva hidrogelova

2.4.3. Potencijalna primena pametnih hidrogelova u tkivnom inženjerstvu

Hidrogelovi se danas koriste kao nosači koji uspešno imitiraju ECM, a cilj im je da obezbede strukturni integritet tkiva koji će olakšati ćelijsku organizaciju i morfogene procese. Hidrogelni nosači mogu imati ulogu tkivnih barijera i bioadheziva, mogu da služe kao depoi za lekove ili za isporučivanje bioaktivnih grupa koje podstiču prirodne reparativne procese [Perale i sar., 2012; Liu i sar., 2015; Parhi, 2017; Larañeta i sar., 2018].

Primena hidrogelova kao nosača u oblasti ćelijske transplantacije

Hidrogelovi su se pokazali krajnje korisnim u oblasti ćelijske transplantacije, s obzirom da potpomažu imunoizolaciju ćelija, bez ometanja difuzije hranljivih sastojaka, kiseonika i metaboličkih produkata. Tako su npr. razvijeni hidrogelovi koji se koriste za transplantaciju ćelija Langerhansovih ostrvaca pankreasa [Cruise i sar., 1999] ili 3D hidrogelovi koji povoljno utiču na adheziju, proliferaciju, migraciju i organizaciju endotelnih ćelija umbilikalne vene [Kraehenbuehl i sar., 2009]. Danas se vrše mnogobrojna istraživanja na eksperimentalnim životinjama u cilju razvijanja

hidrogelova koji će biti pogodni za transplantaciju pluripotentnih matičnih ćelija (npr, embrionalnih ili indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija) i multipotentnih matičnih ćelija (MSCs ili neuralnih). Eksperimenti *in vivo* na životinjskim modelima pokazali su povoljne efekte ovakve terapije u regeneraciji mnogih tkiva, uključujući i nervno tkivo. Tako je na eksperimentalnim modelima oštećenja kičmene moždine pokazano da implantati prirodnih hidrogelova od agaroze, alginata i dr. u koje su inkorporisane matične ćelije, potpomažu pravilno orijentisanu regeneraciju aksona. Sintetički hidrogelovi su ekstremno pogodni kao 3D matrice za MSCs. Eksperimenti su pokazali da 3D matrice od polietil-akrilata (kao što su polihidrogel-metakrilat i polihidroksipropil-metakrilat) sa MSCs uspešno popravljaju oštećenja kod hroničnih povreda kičmene moždine i favorizuju rast aksona. Povoljni efekat u istom smislu pokazali su i kompozitni polusintetički hidrogelovi. Kao 3D nosači za neuralne matične ćelije, u eksperimentima sa oštećenjem kičmene moždine korišćeni su polilizin-polietilenglikol (PEG) i hitozan-metakrilamid, dok su polusintetski hidrogelovi agarozna-*Carbopol* i hijaluronan-PEG testirani sa MSCs [Perale i sar., 2012]. Unakrsno povezani polimer-polimer hidrogelovi, kao što su poli(aldehid-glukuronat) i dihidrazid adipinske kiseline sa MSCs, uspešno su, na animalnim modelima, korišćeni za regeneraciju koštanog tkiva [Parhi, 2017].

Klasa skafolda baziranih na hidrogelovima veoma je važna u tkivnom inženjerstvu zbog svojstva ovih materijala da svoje mehaničke karakteristike prilagode karakteristikama prirodnih tkiva. Skafoldi od hidrogelova koriste se, pre svega, u cilju obezbeđenja mehaničke potpore tkivima koja treba da se regenerišu. Ćelije mogu biti unutar skafolda ili samo pričvršćene na 3D okvir hidrogela. Kada je adhezija ćelija na hidrogelu dominantnija od njihove suspenzije unutar skafolda, tada se, uključivanjem odgovarajućih peptidnih delova na površinu ili u čitavu konstrukciju skafolda od hidrogela, značajno može povećati obim ćelijskog vezivanja. Na primer, jedan on načina da se olakša i ubrza ćelijska adhezija je inkorporacija u hidrogel sekvence adhezionog peptida arginin-glicin-asparaginska kiselina (RGD). Uključivanje ove sekvence poboljšava ćelijsku migraciju, proliferaciju, rast i regeneraciju tkiva [Hersel i sar., 2003]. Pored toga, različite vrste ćelija, kao što su endotelne ćelije, fibroblasti, glatkomišićne ćelije, hondrociti, osteoblasti, pozitivno reaguju i vezuju se za skafolde na bazi hidrogela koji su modifikovani sa RGD. Istraživana je i mogućnost inkorporacije

faktora rasta i matičnih ćelija u određene skafolde, radi njihovog lokalnog isporučivanja do rane, u cilju njenog bržeg i efikasnijeg zarastanja [Akita i sar., 2008], ali su pored povoljnih zapaženi i nepoželjni efekti ovako konstruisanih skafolda.

Hidrogelovi kao depoi lekova

Hidrogelovi se najčešće koriste kao nosači, odnosno depoi lekova, zbog svoje izrazito hidrofилne prirode i biokompatibilnosti. Hidrogelovi, kroz interakciju sa određenim biomolekularnim stimulusima, na *pamet*an način kontrolišu otpuštanje lekova, kako hidrofилnih, tako i hidrofobnih [Peppas, 2006; Peppas i Kim, 2006; Bergmann i Peppas, 2008; Sharpe i sar., 2014; Larraneta i sar., 2018]. Određeni hidrofилni makromolekulski terapeutski agensi, kao što su neki proteini i oligonukleotidi, pokazuju kompatibilnost sa matricom hidrogela. Pored toga kinetiku isporuke željenog leka moguće je kontrolisati preko stepena bubrenja, obima unakrsnih veza i brzine biodegradacije hidrogela. U tu svrhu koriste se najčešće sintetski ili polusintetski hidrogelovi nastali unakrsnim povezivanjem polimer-polimer, fotopolimerizovani hidrogelovi, hidrogelovi nastali enzimatskim povezivanjem i hidrogelovi sa interpenetrirajućim mrežama. Posebno su interesantni fotopolimerizovani hidrogelovi koji služe za lokalizovanu isporuku lekova, baš zbog sposobnosti da se formiraju na licu mesta i usaglašavaju sa ciljnim tkivima. U ovu klasu hidrogelova spada npr. pluronijev hitozan, koji služi za isporuku humanog hormona rasta ili modifikovani hitozan-PEG, koji služi za isporuku faktora rasta ili kao nosač za ćelije. Od hidrogelova nastalih unakrsnim vezivanjem polimer-polimer, izdvajamo unakrsno vezanu hijaluronsku kiselinu koja služi za isporuku aktivatora tkivnog plazminogena. Hijaluronska kiselina modifikovana sa triraminom pomoću enzimatskog unakrsnog povezivanja (peroksidazom iz rena), služi za isporuku deksametazona. Hitozan i PX koji služe za isporuku 5-fluorouracila, primer su hidrogela sa interpenetrirajućim mrežama [Parhi, 2017.]. Pozitivan efekat na rast aksona pokazali su prirodni hidrogelovi kojima se isporučuju aktivne supstance, kao što su metilprednizolon ili moždani neurotrofični faktor [Perale i sar., 2012]. U poslednje vreme veliku pažnju istraživača privlači problem proizvodnje hidrogelova sa hidrofobnim delovima, koji su pogodni za primenu hidrofobnih lekova, zastupljeni su sa 40% među svim lekovima i sve ih je više među lekovima za inovativne terapije. To se postiže inkorporacijom u hidrogelove molekula koji formiraju inkluzione komplekse (npr. ciklodekstrini) ili inkorporacijom hidrofobnih delova. Takvi

hidrogelovi mogu da se koriste u isporuci mnogih citostatika, kao što su *Docetaxel*, *Paclitaxel*, *Herceptin*, *Doxorubiucin* itd. Oni služe i za isporuku nekih lekova koji se koriste u antimikrobnoj terapiji (npr. *Izolikviritigenin*) ili antivirusnoj terapiji (*Penciklovir*), za zarastanje rana (*Astrogalozid IV*) ili lečenje hipertenzije (*Nitrendipin*) itd. [Larraneta i sar.,2018].

Hidrogelovi imaju sposobnost da stvaraju barijere, pa bi lekovi koji su dati lokalno, putem hidrogela, ujedno mogli da inhibiraju pojavu postoperativnih adhezija. Pokazano je da je biorazgradivi fotopolimerizovani sloj hidrogela, koji je formiran na intraperitonealnim tkivima sa ulogom da lokalno oslobađa aktivator plazminogen urokinaze i aktivator tkivnog plazminogena, ujedno doveo do značajnog smanjenja stvaranja adhezija u poređenju sa korišćenjem hidrogelova koji su imali samo barijernu funkciju. Drugi primer objedinjavanja ove dve funkcije su hidrogelovi koji su preko interfejsne foto-polimerizacije formirali jedan ili više slojeva na unutrašnjem zidu krvnih sudova, a korišćeni su za intravaskularnu isporuku lekova [Nguyen i West, 2002].

Jednim od najvećih napredaka u tkivnom inženjerstvu smatra se proizvodnja hidrogelova koji služe za proizvodnju konstrukata sa vaskularnom mrežom. To je naročito važno kod većih 3D tkivnih konstrukata koji su deblji od 200 μm , pa je ograničena ishrana tkiva iz susedne kapilarne mreže. Primer za to su endotelizovane vaskularne tube ili mikrofluidni PEG hidrogel za proizvodnju tkiva jetre [Liu i sar., 2015].

Antibakterijski hidrogelovi

Poslednjih godina izdvojena je, zbog svog velikog značaja, posebna grupa hidrogelova koji se označavaju kao antibakterijski hidrogelovi. Na osnovu sastava matrice hidrogela i vrste antibakterijskog agensa, ovi hidrogelovi su klasifikovani u tri velike grupe: 1) hidrogelovi sa neorganskim nanopartikulama, 2) hidrogelovi sa antibakterijskim agensima i 3) hidrogelovi sa prirodnim antibakterijskim osobinama [Li i sar., 2017; Li i sar., 2018; Xu i sar., 2018; Yang i sar., 2018].

2.5. BIODOKOMPATIBILNOST

2.5.1. Definicija biodokompatibilnosti i šta određuje biodokompatibilnost

Biodokompatibilnost je sposobnost materijala da lokalno pokreće i usmerava normalno zarastanje rana, rekonstrukciju tkiva i njegovu integraciju. Sa

biokompatibilnošću usko je povezan i pojam biotolerantnosti, koji označava sposobnost materijala da se zadržava u telu tokom dugog perioda, uz mali stepen inflamatorne reakcije i bez propratnih nepoželjnih efekata.

Uporedo sa napredovanjem nauke o biomaterijalima i tkivnom inženjerstvu, čiji smo svedoci u poslednjih 70 godina, razvijeni su i dizajnirani novi bioaktivni materijali, uključujući nanomaterijale, tkivne skafolde, složene kombinacije biomaterijala, gde su matične ćelije ili proteini njihov sastavni deo, i organske bioelektronske materijale (provodnike i poluprovodnike), pa procena biokompatibilnosti postaje mnogo specifičnija nego što je to bilo ranije. Nažalost, procena biokompatibilnosti nije se razvila u istom tempu, pa je cilj istraživača u ovoj oblasti da reevaluiraju stare metode procene biokompatibilnosti i uvedu nove metode njenog vrednovanja, naročito u *in vivo* uslovima [Anderson, 2016; Mountuy i sar., 2016; Ratner, 2016; Feron i sar., 2018]. U tom smislu predviđena je i tokom 2017. godine sprovedena revizija standarda ISO 10993–1, u kojoj se insistira na ispitivanju citotoksičnosti na ćelijskim linijama, posebno linijama makrofaga (npr. HL-60, izdvojena kod humane promijelocitne leukemije; U937, izdvojena kod humanog histiocitnog limfoma; mišji peritonealni makrofagi i sl.). Posebno se insistira na ispitivanju sistemske akutne toksičnosti, kao i subakutne, subhronične i hronične toksičnosti [Anderson, 2016]. Pojavili su se i neki konkretni predlozi kako bi, na kvantitativan način, trebalo odrediti biokompatibilnost materijala, pa je Ratner [Ratner, 2016] predložio novu, sledeću formulu za procenu:

$$B = (A) \left(\frac{1}{C_T} \right) \left(\frac{1}{C_D} \right) (M) (M_2/M_1)(O)$$

B–skor biokompatibilnosti; A–angiogeneza (gustina krvnih sudova); CT–debljina kapsule;

CD–gustina kolagena u kapsuli; M–broj makrofaga; M2/M1–odnos M2-polarizovanih prema M1 polarizovanim makrofagima; O–drugi ćelijski tipovi (kompleksan termin).

2.5.2. Biokompatibilnost PVA i hidrogelova na bazi PVA

U pogledu sigurnosti upotrebe i netoksičnosti uopšteno se smatra da je PVA, zbog svoje inertnosti i stabilnosti, bezopasan (bezbedan) za upotrebu i biokompatibilan.

Polivinil-alkohol je bezopasan kada se daje oralno, a oralna akutna toksičnost (LD50) kod pacova iznosi 20 g/kg, a kod miševa 14,7 g/kg [De Merlis i Schoneker, 2003; Kelly i sar., 2003]. Nema podataka o LD50 za primenu putem inhalacije ili za transdermalnu primenu. Ovaj polimer se slabo apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i lako se uklanja iz tela putem stolice [Sanders i Matthews, 1990]. Subakutna toksičnost i studije genotoksičnosti sprovedene na pacovima, pokazale su da je PVA netoksičan

kada se uzima *per os* [Kelly i sar., 2003]. Međutim, ubrizgan supkutano PVA izaziva anemiju [Hall i Hall, 1963.]. Iako se u principu smatra nekancerogenim, neke studije su pokazale da su hidrogelovi PVA kancerogeni u smislu pojave tumora mekih tkiva–fibrosarkoma ili fibrohistiocitoma [Nakamura i sar., 2001].

2.5.3. Biokompatibilnost grafena *in vitro* i *in vivo*

Još uvek nije jasno izučena bezbednost i biokompatibilnost nanopartikula GO na mestu inkorporisanja u tkivu. Karbonske nanotube (CNTs), cilindrični nanokarbonski izotopi grafena, su u u tom smislu mnogo bolje izučeni od grafena i GO. Međutim, uprkos brojnim naporima još uvek nije postignut dogovor u pogledu sigurnosti CNTs. Neke studije nalaze da su CNTs genotoksične i kancerogene [Toyokuni, 2013], dok druge pokazuju da su CNTs potpuno bezbedne za biomedicinsku upotrebu [Machado i sar., 2013]. Smatra se da GO, zbog svoje bolje stabilnosti i rastvorljivosti u vodi, pruža mnogo bolje izgledu u pogledu biokompatibilnosti u odnosu na CNTs. On se u tkivu razgrađuje u roku od nekoliko meseci, odnosno dolazi do autodegradacije tako što se GO rastvara u tečnosti i, kao krajnji produkt razgradnje, stvara se vinilogena karboksilna kiselina [Dimiev i sar., 2012]. Ovaj krajnji, potpuno benigni proizvod je produkt razgradnje svih organskih materija u organizmu i veoma se lako izlučuje iz tela. Nekoliko studija se bavilo procenom toksičnosti GO *in vitro*, sa zaključkom da materijal nije citotoksičan [Duch i sar., 2011; Nayak i sar., 2011; Seabra i sar., 2014], ali je pokazano da GO *in vitro* može izazvati receptorima posredovan inflamatorni odgovor [Chen i sar., 2012; Qu i sar., 2013]. Međutim, ove studije se, tokom procene toksičnosti GO *in vitro*, nisu bavile kompleksnošću fiziološkog i imunskog sistema koji postoji u živom organizmu, pa se stoga ne može doneti zaključak o njegovoj biokompatibilnosti *in vivo*. Potrebna su dalja istraživanja da bi se doneo definitivni sud o biokompatibilnosti GO [Kostarelos i Novoselov, 2014]. Studije koje su se bavile procenom toksičnosti, biokompatibilnosti i nivoom očuvanosti GO *in vivo*, koristile su evolutivno niže organizme; genotoksičnost je proučavana na nematodama [Wu i sar., 2014], a istraživanja na zebrecama su pokazala da se GO brzo razlaže i da ne ostavlja trajne efekte [Liu i sar., 2013]. Ispitivanje biokompatibilnosti grafena na sisarskim vrstama nije dalo usaglašene ni definitivne rezultate. Uopšteno, biokompatibilnost GO zavisi od tipa funkcije [Liu i sar., 2013.] i njegovog oksidacionog stanja [Duch i sar., 2011; Liu i sar., 2013].

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ove studije jeste da se ispita biokompatibilnost dva novosintetisana i prethodno *in vitro* okarakterisana hidrogela na bazi sintetskog polimera polivinil-alkohola – Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, koji su namenjeni za izradu obloga za rane ili za implantate za meka tkiva. U tom cilju praćena je reakcija mekog tkiva na duboko potkožno postavljene navedene implantate i poređena je sa reakcijom na komercijalnu oblogu za rane na bazi kalcijum-alginata – Suprasorb, koja je implantirana na identičan način.

Za ostvarenje navedenog cilja postavljeni su sledeći zadaci istraživanja:

- 1) da se procenom tkivnog IrI (ISO 10993-6) utvrdi osnovna mera tkivnog odgovora na implantirane hidrogelove;
- 2) da se odredi debljina vezivnotkivne kapsule koja okružuje implantate, s obzirom da je ta mera u obrnutoj korelaciji sa stepenom biokompatibilnosti;
- 3) da se odredi brojnost inflamatornih ćelija u vezivnotkivnoj kapsuli, kao i njihova eventualna migracija u materijal, kao jedan od ključnih mehanizama biodegradacije;
- 4) da se odredi brojnost makrofaga u kapsuli i perikapsularnoj zoni, s obzirom da je brojnost makrofaga (naročito M2) direktno povezana sa nefibrotičnom integracijom implantiranih materijala i boljom biokompatibilnošću;
- 5) da se proceni ekspresija važnih komponenti ekstracelularnog matriksa (ECM), kolagena tipa I, kolagena tipa III i laminina u koži u zoni implantacije i vezivnotkivnoj kapsuli oko implantata, da bi se procenilo remodelovanje ECM, ali i kolageneza, s obzirom da je gustina kolagena u kapsuli obrnuto proporcionalna biokompatibilnosti;
- 6) da se proceni brojnosti krvnih sudova oko zone implantacije i tako dobije uvid u proces vaskulogeneze, koji je ključan za tkivnu regeneraciju i “vaskularizovanu” tkivnu integraciju implantiranog biomaterijala;
- 7) da se odredi proliferacija i apoptoza keratinocita kože, kao i proliferacija i apoptoza fibroblasta kapsule, da bi se procenilo da li su implantirani materijali eventualno narušili odnos proliferacije i apoptoze ćelijskih entiteta kože i potkožnog tkiva;
- 8) da se procene eventualna promena oblika i veličina implantiranih materijala *in vivo* u odnosu na izgled i početnu veličinu pre implantacije, koje mogu da nastanu kao rezultat njihovog bubrenja ili degradacije;
- 9) da se uporede svi ispitivani parametri dobijeni *in vivo* između supkutano aplikovanog Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i komercijalnog Suprasorba.

4. MATERIJAL I METODE

Ova studija je dizajnirana sa ciljem da se ispita biokompatibilnost dva novosintetisana i prethodno *in vitro* okarakterisana hidrogela na bazi sintetskog polimera od polivinil-alkohola – Ag/PVA (srebro/polivinil alkohol) i Ag/PVA/Gr (srebro/polivinil-alkohol/grafen), koji su namenjeni za izradu obloga za rane ili za implantate za meka tkiva. U tom cilju praćena je reakcija mekog tkiva na duboko potkožno postavljene implantate od Ag/PVA i Ag/PVA/Gr i poređena je sa reakcijom na komercijalnu oblogu za rane na bazi kalcijum-alginata (*Suprasorb*©, *Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Germany*), koja je implantirana na identičan način.

4.1. ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA I METODE KARAKTERIZACIJE NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA

U toku sinteze nanokompozitnih hidrogelova koristile su se sledeće hemikalije: poli(vinil-alkohol) prah ($M_w = 70000-100000$; *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD*), srebro nitrat (*M. P. Hemija, Beograd, Srbija*), kalijum-nitrat (*Centrohem, Stara Pazova, Srbija*) i grafen u prahu (*Graphene Super-market, Calverton, NY, SAD*). U toku celog eksperimenta korišćena je ultra čista voda Mili-Q (*Millipore, Billerica, MA, SAD*).

4.1.1. Sinteza PVA i PVA/Gr hidrogelova

Sinteza hidrogelova Ag/PVA i Ag/PVA/Gr obavljena je u skladu sa već objavljenom procedurom [*Abudabbus i sar., 2016*]. Vodeni rastvor PVA (10 mas.%) pripremljen je rastvaranjem praha PVA u destilovanoj H₂O, zagrejanoj na 90°C. Dodavanjem grafena, uz energično mešanje, pripremljena je disperzija PVA/Gr kako bi se dobila konačna koncentracija od 10 mas.% PVA i 0,01 mas.% Gr. Nakon hlađenja, koloidna disperzija PVA/Gr podvrgnuta je sukcesivnom zamrzavanju i odmrzavanju u pet ciklusa. Svaki ciklus se sastojao od zamrzavanja na temperaturi od -18°C tokom 16h i odmrzavanja na temperaturi od 4°C tokom 8h.

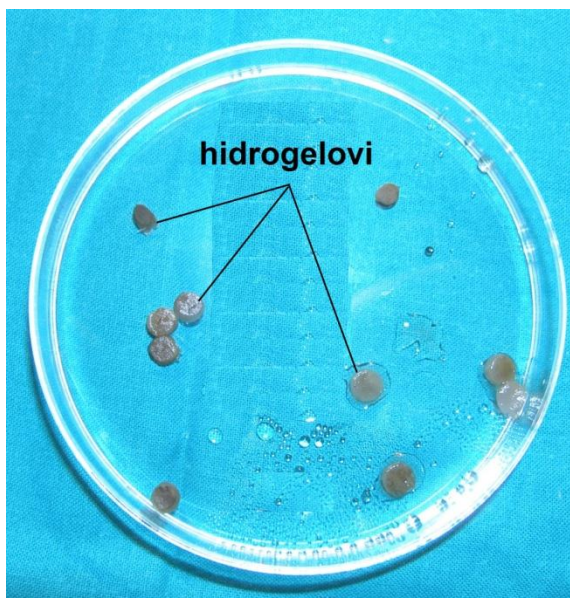
4.1.2. Elektrohemijaska sinteza nanokompozitnih hidrogelova od Ag/PVA i Ag/PVA/Gr

Za sintezu nanočestica srebra (*eng. silvernanoparticles, AgNPs*), dobijeni hidrogelovi su isećeni na male diskove (prečnika 5mm i širine 0,2mm), a oni su zatim

bubreni u rastvoru prekursora koji se sastojao od 0,25mM AgNO₃ i 0,1M KNO₃ na temperaturi od 25⁰C, tokom 48h. *In situ* elektrohemijska sinteza AgNPs izvedena je elektrohemijom redukcijom jona Ag⁺ pri konstantnom naponu unutar matrica PVA i PVA/Gr. Uzorci hidrogelova su postavljeni u specijalno napravljenu staklenu elektrohemijsku ćeliju, između dve Pt elektrode. Za elektrohemijsku sintezu je korišćen *MA 8903 Electro-Phoresis Power Supply* (Iskra d.d., Ljubljana, Slovenija). Sintaza je sprovedena pri konstantnom naponu od 90 V, sa vremenom implementacije od 4 min, dok se polaritet elektroda menjao na svaki minut [Abudabbus i sar., 2016, 2018]. Pre i nakon svakog eksperimenta elektrode su ispirane u rastvoru HNO₃ i destilovane H₂O (1:1).

4.2. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE I PROCEDURA IMPLANTACIJE HIDROGELOVA

Za implantaciju hidrogelova u potkožno tkivo životinja korišćeni su pacovi kao eksperimentalne životinje (soj Albino, rasa Wistar), ženskog pola, starosti 3 meseca, težine 250-300 gr. U eksperimentu je bilo ukupno 16 životinja. Sve eksperimentalne životinje držane su pod istim laboratorijskim režimom nege i ishrane sa dopuštanjem Etičkog komiteta Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.



Slika 4.1. Izgled novosintetisanih hidrogelova na bazi Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, pripremljenih u vidu diskova.

Životinje su podeljene u IV grupe, u zavisnosti od vremena žrtvovanja nakon implantacije (7, 15, 30. i 60. dana), a u svakoj grupi su se nalazile po četiri jedinke. Nanokompozitni hidrogelovi od Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, pripremljeni u vidu diskova prečnika 5 mm i debljine 0,2 mm (sl. 4.1), kao i komercijalna obloga za rane na bazi kalcijum-alginata, *Suprasorb*, implantirani su u subkutano tkivo pacova u leđnoj regiji.

Kod sve četiri grupe životinja, koje su žrtvovane u navedenim vremenskom terminima nakon hirurškog zahvata, implantati od hidrogelova bili su postavljeni na identičan način: sa leve strane kičmenog stuba Ag/PVA (gore) i Ag/PVA/Gr (dole), a sa desne strane *Suprasorb* (gore), dok je incizionna rana bila načinjena ispod implantiranog *Suprasorba*.

4.2.1. Hirurška tehnika implantacije

Pre implantacije hidrogelovi su sterilisani u autoklavu 30 min na 134°C. Set instrumenata potreban za implantaciju takođe je sterilisan u autoklavu. Pridržavajući se principa asepse-antiseptičke, pripremljeno je operaciono polje (sl. 4.2). Priprema životinja podrazumevala je: klinički pregled, pripremu operacionog polja i indukovanje životinje u opštu anesteziju.

S obzirom da postupak implantacije ima određeni stepen invazivnosti, kao i da su životinje osetljive na stres i bol, sama implantacija je izvedena u opštoj injekcionoj anesteziji, intraperitonealnom aplikacijom 75 mg/kg ketamin-hidrohlorida (*Ketamodor* 10%, 100 mg/ml, *RICHTER PHARMA AG, Austrija*) i 20 mg/kg ksilazina (*Xylased* 2%, *BIOVETA, Češka*). Pre zahvata supkutano je aplikovan analgetik butorfanol, 1mg/kg (*Nembutal, OAK*). Posle uvođenja pacova u anesteziju, operativno mesto je obrijano i dezinfikovano rastvorom povidon-jodida. Implantati su plasirani u odgovarajuće zone, ranije opisane. Plasiranje implantata u potkožno tkivo izvedeno je sa minimalnim stepenom invazivnosti po tkivo, korišćenjem odgovarajućih instrumenata za preparisanje tkiva i postavljanjem implantata na željeno mesto (sl. 4.3 i 4.4).

U postoperativnom periodu praćenja svaka životinja je smeštena u zasebni kavez i klinički je kontrolisana 4 puta dnevno. Tokom tri postoperativna dana životinje su tretirane terapijom za smanjivanje bola (*Butorfanol*, supkutano, 10 mg/kg, *RICHTER PHARMAAG, Austrija*).



Slika 4.2. Životinja u anesteziji sa pripremljenim operacionim poljem.

Skalpelom je napravljena mala incizija (sl. 4.3) paralelna sa kičmenim stubom i načinjena su četiri džepa promera 0,5 cm duboko u supkutisu (odnosno u vezivnom tkivu ispod kutanog mišića) u koje su ubačeni odgovarajući implantati (sl. 4.4).

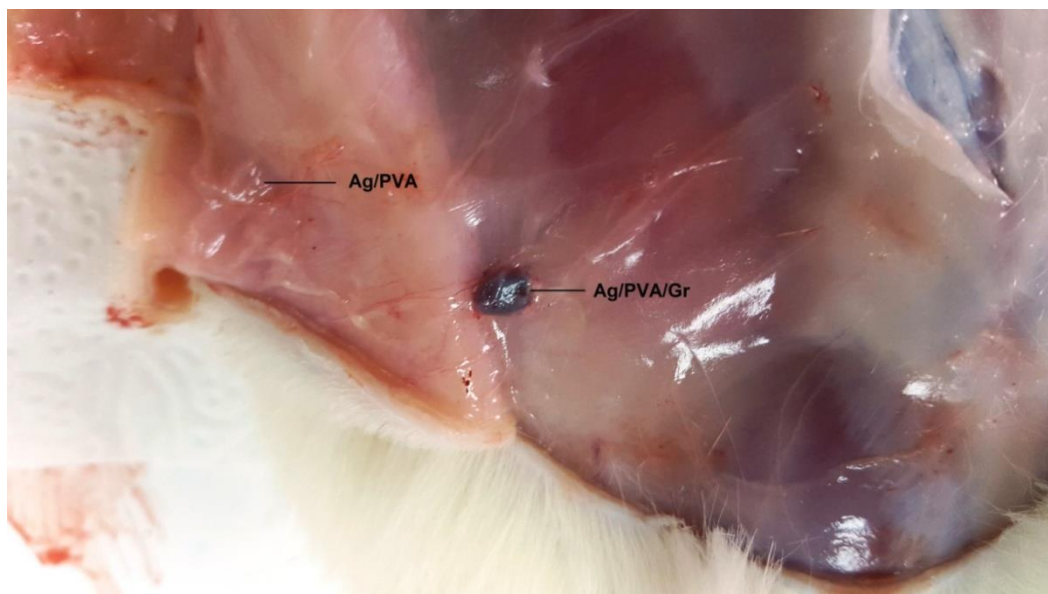


Slika 4.3. Postavljanje incizije.



Slika 4.4. Postupak preparisanja tkiva i implantiranja biomaterijala.

Kao što je već napomenuto, životinje su žrtvovane 7, 15, 30. i 60. dana nakon implantacije, radi prikupljanja uzoraka za histološku analizu. Žrtvovanje je obavljeno intraperitonealnom injekcijom rastvora pentobarbitona, 160 mg/kg (*Euthasol* 400 mg/ml, *Produlab B.V., Holandija*). Nakon žrtvovanja životinja uzeto je tkivo iz implantacionog područja, zajedno sa implantatom (sl. 4.5) i kožom iznad implantacionog područja, u celoj njenoj debljini. Takođe je uzorkovano i tkivo kože iz područja u kome je tokom implantacije napravljena prosta hirurška rana (zona incizije i zona lažne operacije). Intaktni uzorak kože sa dorzalne strane vrata predstavljao je kontrolnu zonu kože udaljenu od mesta implantacije.



Slika 4.5. Izgled *in situ* hidrogelova od Ag/PVA i Ag/PVA/Gr implantiranih supkutano, prilikom žrtvovanja eksperimentalne životinje.

4.2.2. Monitoring eksperimentalnih životinja

Eksperimentalne životinje su bile pod konstantnim monitoringom tokom pripreme i trajanja operativnog zahvata. U cilju monitoringa korišćen je veterinarski monitor (*Votem v7 Patient-monitor, Koreja*), putem koga su praćeni rad srca, respiracija, saturacija gasova, telesna temperatura i krvni pritisak.

4.3. HISTOLOŠKA ISPITIVANJA

Nakon žrtvovanja životinja u svakom od eksperimentalnih termina (7, 15, 30. i 60. dana), uzimani su uzorci tkiva iz odgovarajućih zona implantacije, kao i kontrolni uzorci tkiva iz zone lažne operacije i intaktne zone udaljene od mesta implantacije, kako je već napred navedeno.

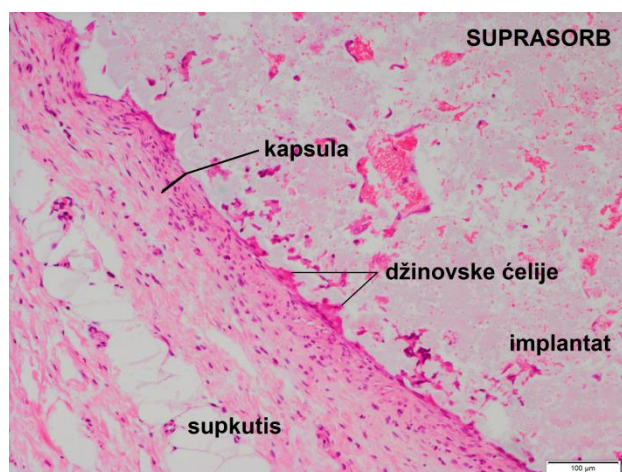
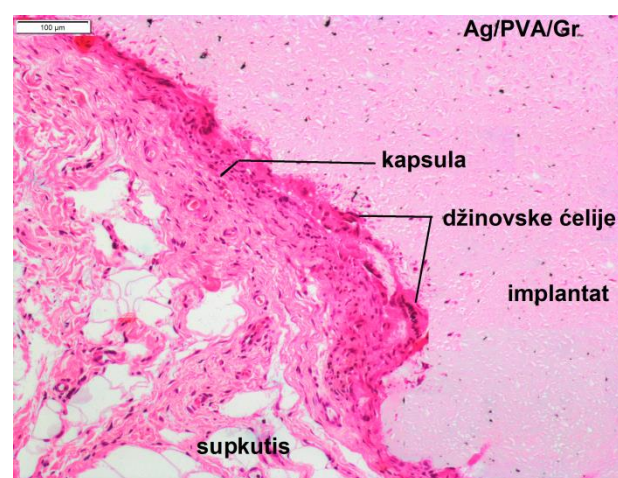
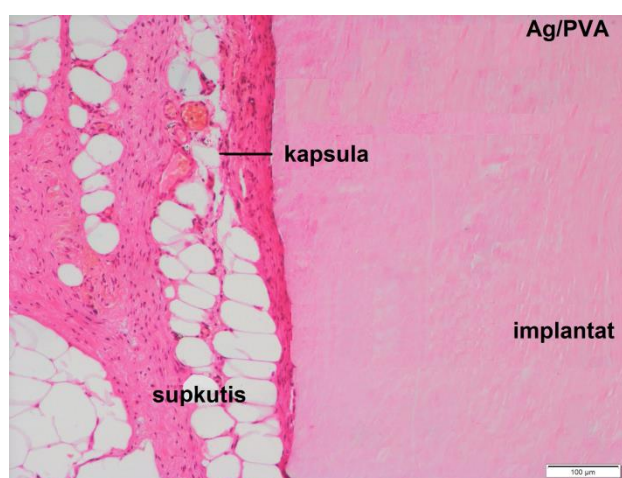
4.3.1. Priprema histoloških preparata

Materijal za histopatološku analizu pripreman je na standardni način. Uzorci su fiksirani u 4% neutralnom puferisanom rastvoru formalina, a potom su dalje pripremani rutinskom procedurom, koja je obuhvatala dehidrataciju, prosvetljavanje, impregnaciju i kalupljenje u parafinu / paraplustu (*Bio-Plast plus, BioOptica, Italija*). Tkivni uzorci sečeni su na mikrotomu (*RM 2255, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Nemačka*), a tkivni preseki debljine 4-5 μm montirani su na specijalne staklene pločice prevučene

jakim adhezivnim sredstvom (*SuperFrost Plus, Dako, Nemačka*), sušeni su 60 min u termostatu na 56⁰C, a potom bojeni standardnim postupkom bojenja hematoksilinom i eozinom (H&E) i AZAN trihromskim bojenjem.

4.3.2. Hematoksilin-eozin bojenje

Tkivni preseci su bojeni H&E koristeći standardnu proceduru bojenja. Sa histoloških preparata obojenih ovom metodom, procenjuvani su svi parametri na osnovu kojih je izračunavan tkivni iritacioni indeks kod supkutane aplikacije različitih hidrogelova, uključujući i debljinu vezivnotkivne kapsule (sl. 4.6, 4.7 i 4.8).

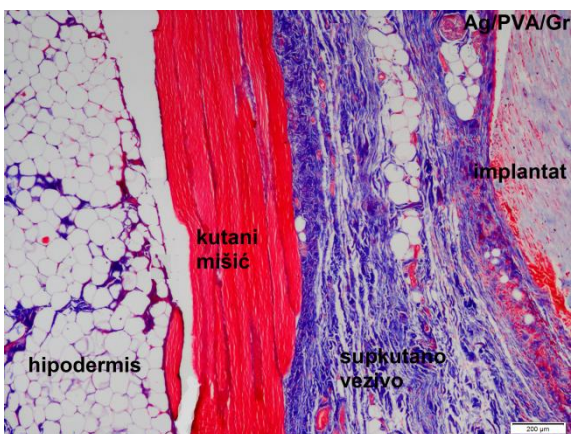
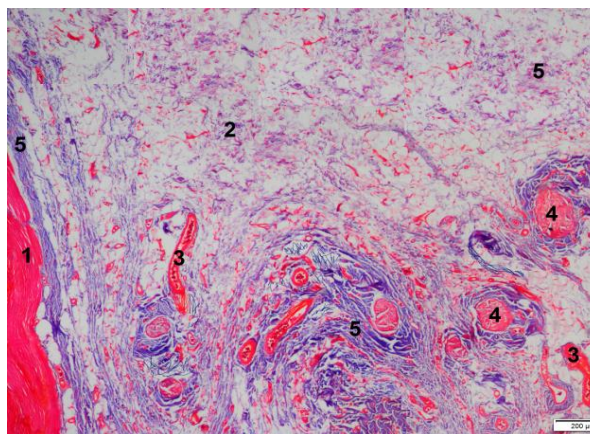
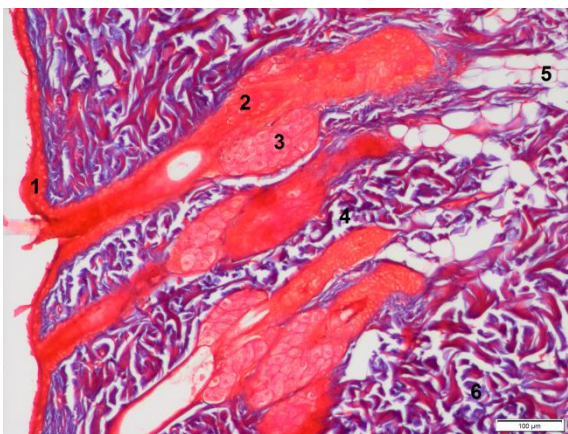


Slike 4.6, 4.7 i 4.8. Supkutano vezivno tkivo sa implantatima od različitih hidrogelova – Ag/PVA (sl. 4.6, gore levo), Ag/PVA/Gr (sl. 4.7, gore desno) i Suprasorba (sl. 4.8, dole), okruženih vezivnotkivnom kapsulom. H&E, bar: 100µm.

4.3.3. AZAN trihromsko bojenje

Za specijalno Azan trihromsko bojenje korišćen je komercijalni kit proizvođača Bio-Optica (*Azan trichrome 04-001802; Strumentazioni Scientifiche, Bio-Optica, Milano, Italija*) i poštovan je protokol za upotrebu kita.

Ova metoda koristi se za prikazivanje vezivnog tkiva, kao i za prikazivanje mišićnog tkiva, neuroglije, kolagenih i retikularnih vlakana, eritrocita i jedarnog hromatina, strome glomerula bubrega i adenohipofize. U metodi se koriste dve kisele boje: azokarmin i anilinsko plavo. Rezultati bojenja su sledeći: kolagena i retikularna vlakna su obojena tamnoplavo, mišići su obojeni narandžasto do crveno, eritrociti i hromatin su crveni (sl. 4.9, 4.10 i 4.11).



Sl. 4.9. Uzorak intaktne kože pacova (gore levo). 1. epidermis, 2. folikul dlake, 3. lojna žlezda, 4. dermis, 5. hipodermis, 6. kolagena vlakna (plavo obojena). Azan trihromsko bojenje, bar:100μm.

Sl. 4.10. Supkutano vezivno tkivo ispod uzorka intaktne kože (gore desno). 1. kutani mišić, 2. supkutano vezivo, 3. krvni sud, 4. nervno fascikulusi, 5. kolagena vlakna (plavo obojena). Azan trihromsko bojenje, bar:200μm.

Sl. 4.11. Implantat i periimplantna zona (dole). Azan trihromsko bojenje, bar:200μm.

4.3.4. Određivanje indeksa tkivne iritacije (iritacionog indeksa) u zoni implantacije hidrogelova, na osnovu histoloških ispitivanja

Ispitivanje biokompatibilnosti hidrogelova sprovedeno je u skladu sa međunarodnim standardom ISO 10993-6: 2007. Primenjeni standard uključivao je testiranje i procenu lokalne reakcije tkiva na mestu gde je implantiran ispitivani

biomaterijal. Semikvantitativna procena patohistoloških promena u koži kod pacova sa implantiranim hidrogelovima obuhvatala je promenu epitela (od normalnog epitela, preko ćelijske degeneracije, hiperplazije i fokalnih erozija, do generalizovanih erozija), procenu stepena infiltracije leukocita, prisustvo vaskularne kongestije i edem. Takođe je registrovano i prisustvo ili odsustvo kapsule i njena relativna debljina. Na osnovu procene svih navedenih parametara (tabela 4.1) izračunavan je iritacioni indeks (IrI), kao mera težine oštećenja tkiva na mestu implantacije (tabela 4.2).

Tabela 4.1. Sistem ocene patohistološkog pregleda kože i supkutisa na mestu implantacije

Reakcija	Numeričko ocenjivanje
EPITEL	
Normalni, intaktni	0
Ćelijska degeneracija	1
Metaplazija	2
Fokalna erozija	3
Generalizovana erozija	4
LEUKOCITNA INFILTRACIJA (na velikom uveličanju)	
Odsutni	0
Minimalno (manje od 25)	1
Blago (od 26-50)	2
Umereno (od 51-100)	3
Izrazito (preko 100)	4
VASKULARNA KONGESTIJA	
Odsutna	0
Minimalna	1
Blaga	2
Umerena	3
Izrazita, sa pucanjem krvnog suda	4
EDEM	
Odsutan	0
Minimalan	1
Blagi	2
Umeren	3
Izrazit	4
KAPSULA	
Odsutna	0
Minimalna	1
Tanka	2
Umerena	3
Debela	4

Tabla 4.2. Procena indeksa tkivne iritacije (iritacionog indeksa)

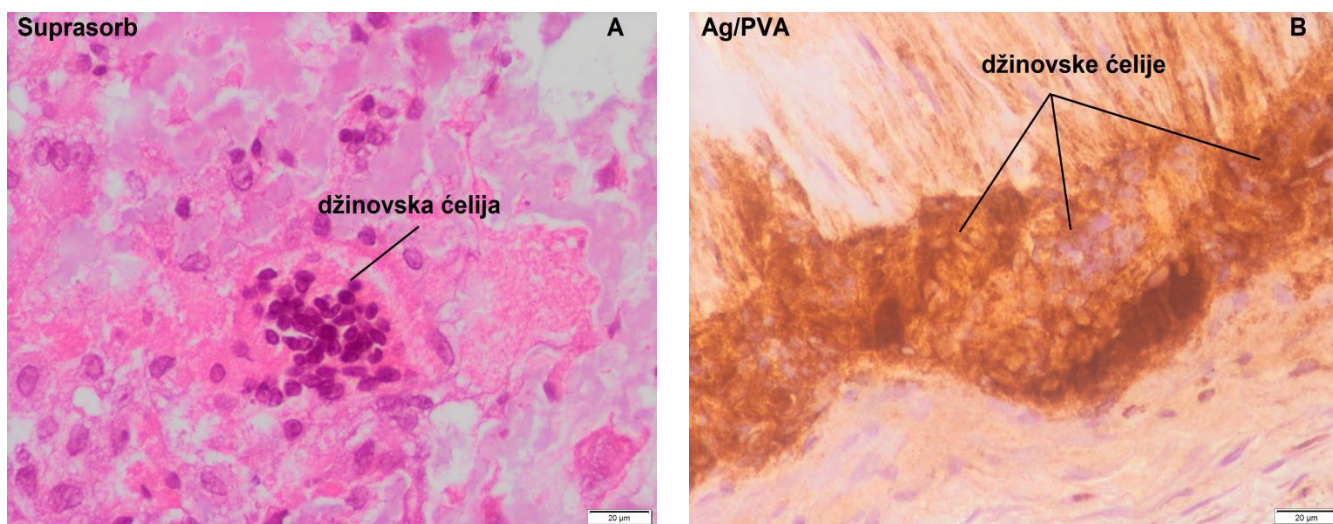
IRITACIONI INDEKS (IrI)	
Prosečan odgovor	Opis odgovora
0	nema
1-5	minimalni
6-10	blag
11-15	umeren
16-20	jak

4.4. MORFOMETRIJSKA ISPITIVANJA

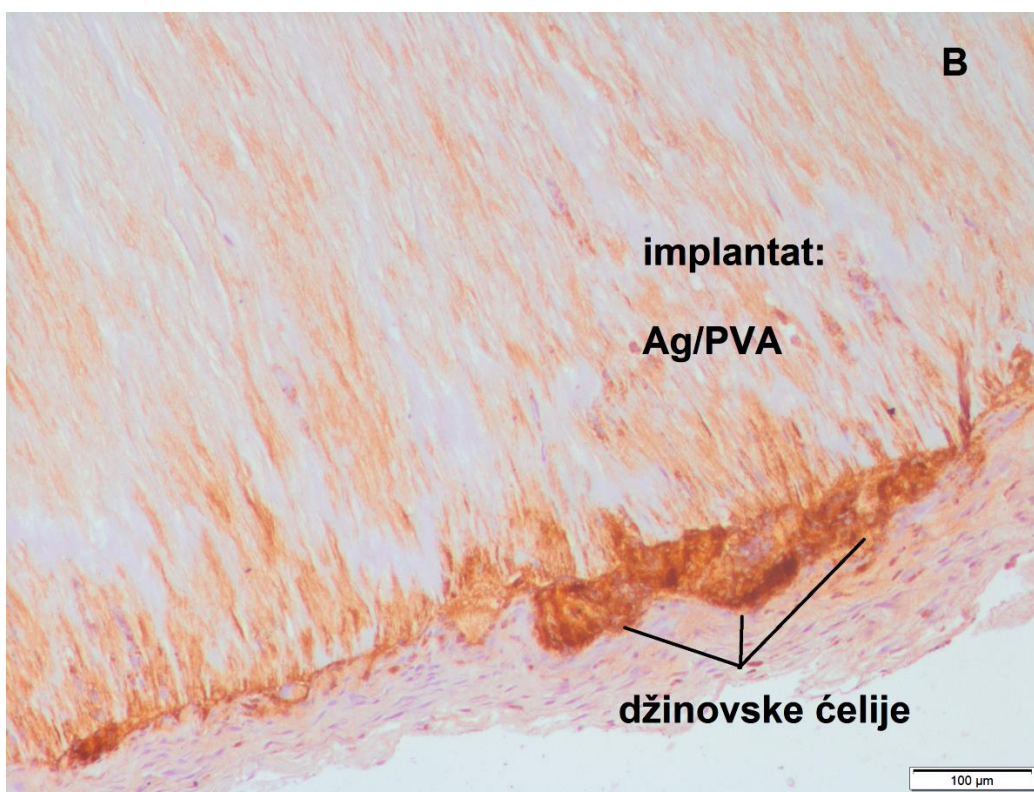
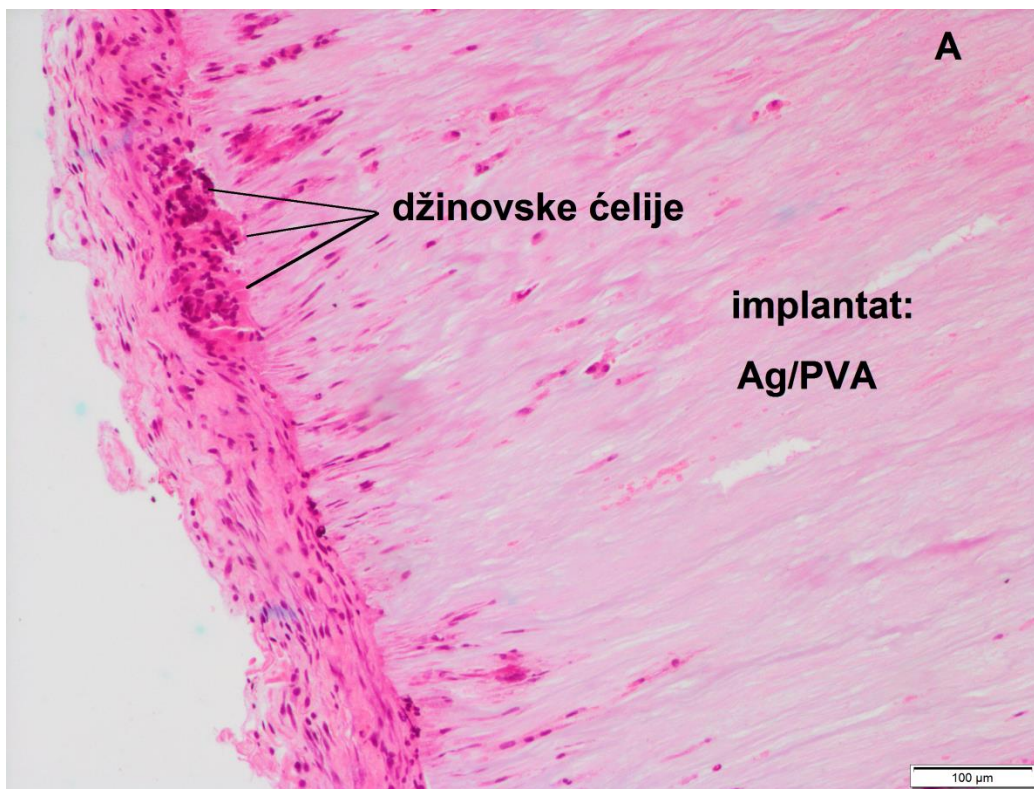
Morfometrijska merenja su se odnosila na merenje debljine epidermisa i debljine vezivnotkivne kapsule oko implantiranog materijala, kao i brojanje ćelija u okviru inflamatornog infiltrata nakupljenog u periimplantnoj zoni.

Debljina kapsule merena je pomoću okularnog mikrometra na uveličanju 100x. Izmerena je ukupna debljina kapsule na reprezentativnim poljima sve četiri strane (gore, dole, levo i desno) i izražena je u μm , kao srednja vrednost.

Leukociti su u periimplantnoj zoni brojani u pet reprezentativnih područja svakog uzorka, pomoću okularne mreže površine $0,250 \text{ mm}^2$, na uveličanju 40x. Rezultati su izraženi kao broj inflamatornih ćelija na 1 mm^2 površine.



Slika 4.12. Tipičan izgled džinovskih ćelija tipa oko stranog tela u slučaju implantacije hidrogelova od Suprasorba (A) i Ag/PVA (B), 7. postoperativnog dana. A, H&E, bar:20 μm ; B, IHH bojenje na CD68, bar:20 μm .



Slika 4.13. Džinovske ćelije tipa oko stranog tela duž oboda implantata od Ag/PVA, 7. postoperativnog dana. A, H&E, bar: 100 µm; B, IHH bojenje na CD68, bar: 100 µm.

Džinovske ćelije brojane su oko svakog implantata, sa 8 do 10 sukcesivnih tkivnih preseka obojenih različitim metodama (H&E i Azan trihromskim bojenjem), kao i sa preparata obojenih imunohistohemijskim metodama na α -glatkomišićni aktin, laminin, kolagen tipa I i III, Ki67, jednolančanu DNK i CD68, s obzirom da su se ove ćelije karakterističnog izgleda jasno uočavale na svim tkivnim presecima (sl. 4.12). Broj džinovskih ćelija izražavan je kao ukupni broj ćelija/mm obima implantata na svakom analiziranom tkivnom preseku (sl. 4.13). Obim implantata određivan je njegovim direktnim merenjem sa preparata, uz pomoć softvera za morfometrijska merenja *CellSens Entry*.

S obzirom na varijabilnu veličinu džinovskih ćelija oko različitih implantata, semikvantitativno je procenjivano u kom procentu džinovske ćelije okupiraju obim elipse na sledeći način: 0, nema džinovskih ćelija; 1+, do 10% obima elipse okupirano je džinovskim ćelijama; 2+, od 11% do 30% obima elipse okupirano je džinovskim ćelijama; 3+, od 31% do 50% obima elipse okupirano je džinovskim ćelijama; 4+, od 51 do 80% obima elipse je okupirano džinovskim ćelijama i 5+, preko 80% obima elipse okupirano je džinovskim ćelijama

Sva navedena merenja vršena su na standardnom mikroskopu *Olympus CX31* i obrađena softverom za morfometrijska merenja *CellSens Entry* (*Olympus, Tokio, Japan*). Histološki preparati su snimani digitalnim fotoaparatom *Olympus UC50*.

4.5. IMUNOHISTOHEMIJSKA ISPITIVANJA

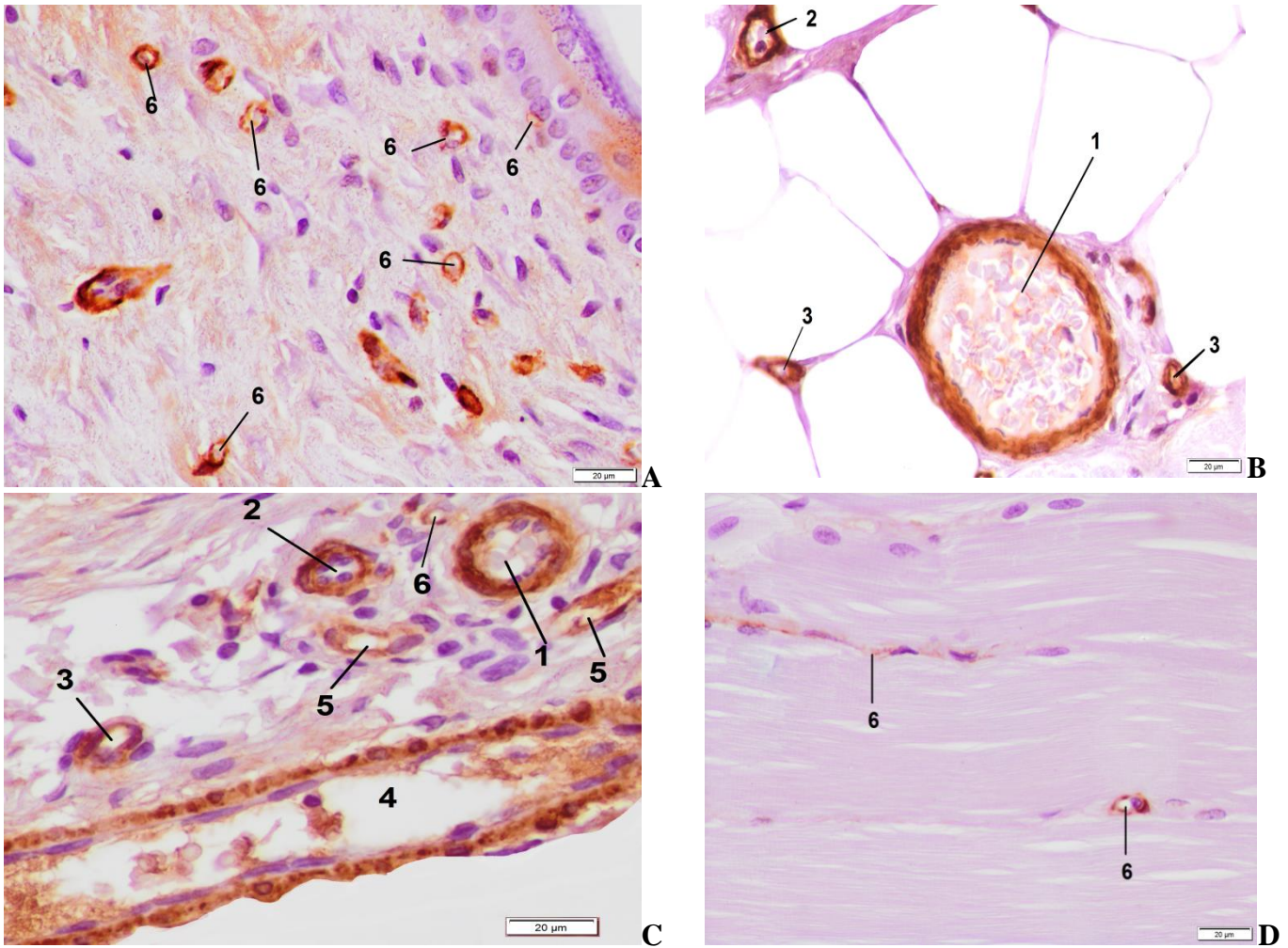
4.5.1. Primarna antitela

Imunohistohemijska ispitivanja su izvršena na tkivnim presecima debljine 4-5 μ m uzoraka kože, ukalupljenim u parafin, a koji su prethodno fiksirani u 4% rastvoru puferisanog neutralnog formalina. Isečeni preseki montirani su na pločice prevučene adhezivnim sredstvom (*SuperFrost Plus, Dako, Nemačka*) i osušeni na temperaturi od 56⁰C u toku jednog sata. U tabeli 4.3. dat je pregled korišćenih antitela i primenjene imunohistohemijske (IHH) metode bojenja u cilju dokazivanja ekspresije sledećih antigena (ćelijskih/tkivnih markera): alfa-glatkomišićnog aktina – α GMA, kolagena I (Kol I) i Kol III, laminina (Lam), Ki-67, jednolančane DNK (*single strand DNA, ssDNA*) i CD 68.

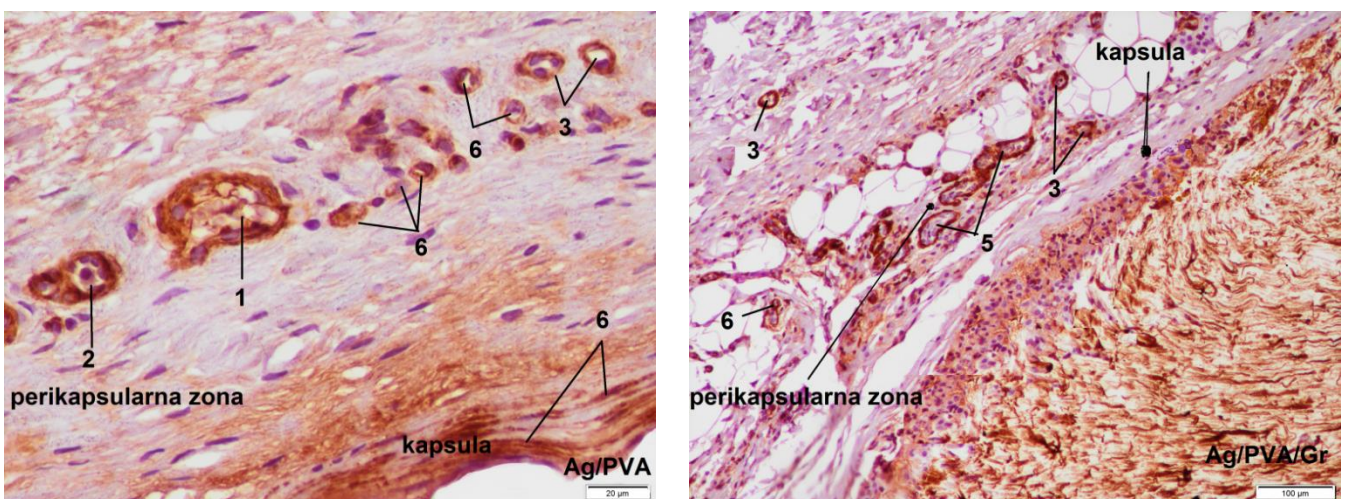
Tabela 4.3. Pregled primarnih antiseruma i vizuelizacije imunohistohemijske metode (IHH)

Primarni antiserum, proizvođač, No	Klon	Imunogen	Unakrsna reaktivnost	Razblaženje primarnog antiseruma; demaskiranje antigena	IHH metoda
α-GMA* Abcam, UK,ab124964	monoklonski zečiji	sintetski peptid sa humanom aminokiselinskom sekvencom na α-GMA, ak 1-100 (N-terminalni deo).	miš, pacov, čovek	1:100; alkalni pufer, pH 9, 20 min	<i>Thermo Scientific UltraVision LP/ HRP Polymer</i>
Laminin Abcam, UK,ab11575	poliklonski zečiji	laminin izolovan iz bazalne membrane Englebreth Holm-Swarm (EHS) mišjeg sarkoma	miš, pacov, konj, pas, čovek, svinja	1:200; citratni pufer, pH6, 20 minuta	<i>Thermo Scientific UltraVision LP/ HRP Polymer</i>
Kolagen I Abcam, UK,ab34710	poliklonski zečiji	kompletan purifikovan nativni protein homologan aminokiselinskoj sekvenci humanog kolagena tipa I, ak 1-1464.	miš, pacov, ovca, konj, čovek, svinja, majmun	1:500; citratni pufer, pH 6, 20 minuta	<i>Thermo Scientific UltraVision LP/ HRP Polymer</i>
Kolagen III Abcam, UK, ab6310	monoklonski mišji, FH-7A	kompletan humani purifikovan nativni protein	pacov, čovek	1:1000; citratni pufer, pH 6, 20 minuta	<i>Thermo Scientific UltraVision LP/ HRP Polymer</i>
Ki-67 Abcam, UK,ab16667	monoklonski zečiji	sintetski peptid sa humanom aminokiselinskom sekvencom Ki67, ak 2300-2400 (C-terminalni deo)	miš, pacov, čovek, majmun	1:300; citratni pufer, pH 6, 20 min	<i>Thermo Scientific UltraVision LP/ HRP Polymer</i>
ssDNA** Millipore, USA, AB3299	monoklonski mišji, F7-26	teleća timusna ssDNA	sve vrste	1:10; citratni pufer, pH 6, 20 min	<i>Thermo Scientific UltraVision LP/ HRP Polymer</i>
CD 68 Bio RAD, CA, USA, MCA34 1R	monoklonski antipacovski ED1	ćelije slezine pacova	pacov, govedo	1:100; citratni pufer, pH 6, 20 min	<i>Thermo Scientific UltraVision LP/ HRP Polymer</i>

*α-GMA, alfa-glatkomišićni aktin, ssDNA, **jednolančana DNK (single strand DNA)



Slika 4.14. Krvni sudovi vizuelizovani IHH bojenjem na α -GMA (smeđa prebojenost) u dermisu, (A), hipodermisu (B), kutanom mišići (C) i supkutanom vezivnom tkivu (D) u intaktnoj koži pacova iz kontrolne grupe, bar:20 μ m. 1. arteriola, 2. preterminalna arteriola, 3. terminalna arteriola, 4. mala vena, 5. mišićna venula, 6. kapilar.



Slika 4.15. Krvni sudovi vizuelizovani IHH bojenjem na α -GMA (smeđa reakcija) u vezivnotkivnoj kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu, kod supkutane implantacije hidrogela od Ag/PVA (levo), bar:20 μ m i Ag/PVA/Gr (desno), bar:100 μ m. Legenda kao na sl. 4.15.

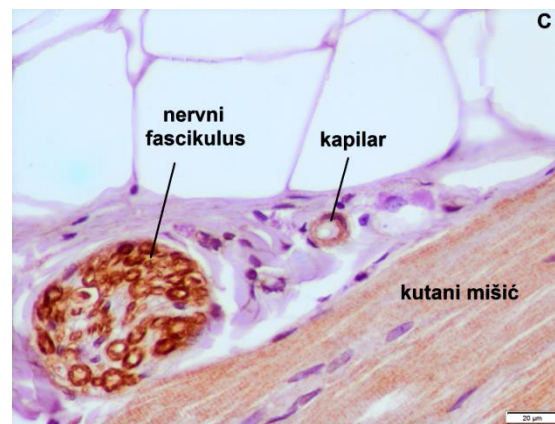
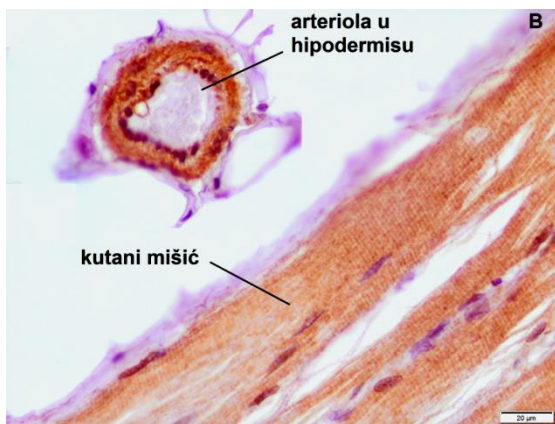
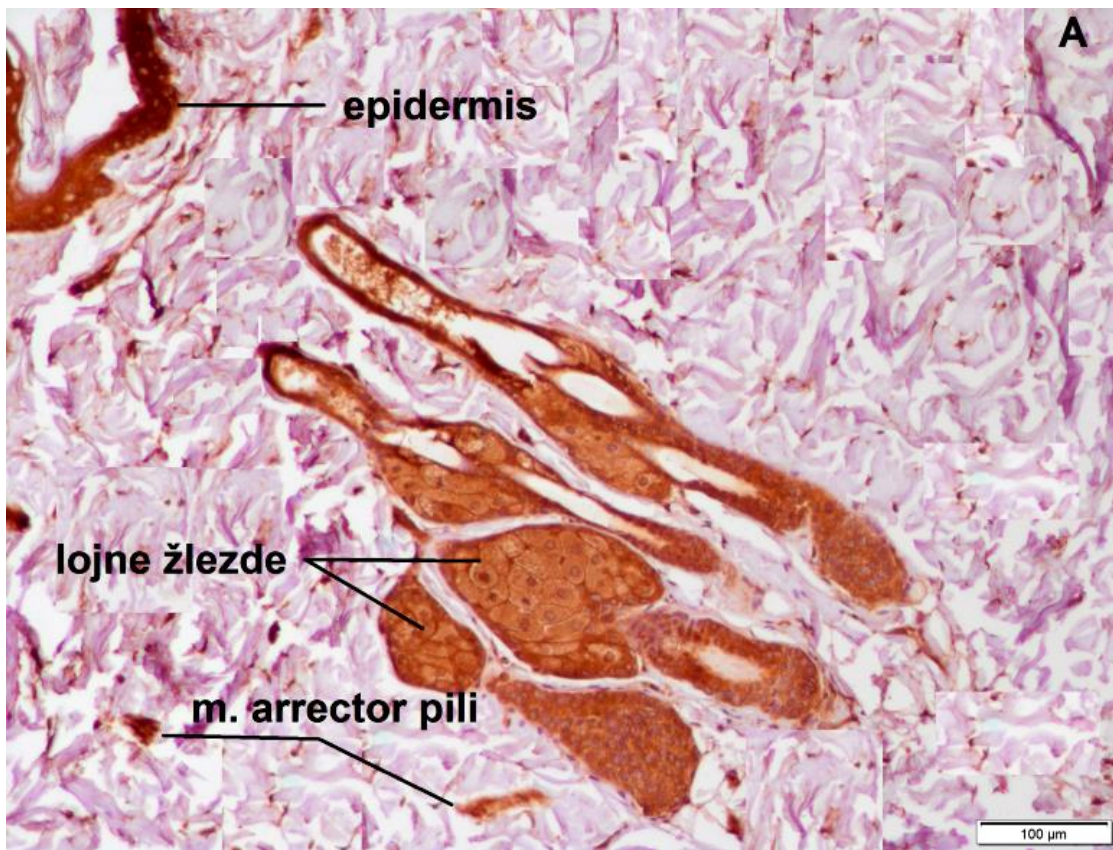
Alfa-glatkomišićni aktin je globularni protein koji formira mikrofilamente. Imunohistohemijsko bojenje na α -GMA korišćeno je u cilju precizne vizuelizacije krvnih sudova, s obzirom da se sa antitelom na ovaj intermedijarni filament boje glatke mišićne ćelije u tuniki mediji svih krvnih sudova, uključujući i mikrovaskularno korito i pericite u kapilarima (sl. 4.14 i 4.15).

Laminin je heterotrimerni glikoprotein velike molekularne mase, koji se nalazi u ECM. On je glavna komponenta bazalne lamine. Osim toga, laminin može da povezuje ćelijske membrane susednih ćelija i može da se vezuje za različite molekule ECM., Neke forme laminina, nakon izlučivanja iz keratinocita, Švanovih ćelija, endotelnih ćelija i drugih ćelija, mogu da se deponuju u ECM. Laminini igraju važnu ulogu u tkivnoj morfogenezi i homeostazi, s obzirom da regulišu tkivnu arhitekturu, ćelijsku adheziju, migraciju (naročito ukoliko su deponovani u ECM oko keratinocita) i ćelijsku signalizaciju posredovanu ECM. Imunohistohemijsko bojenje na laminin imalo je za cilj da pokaže topografsku distribuciju ovog važnog glikoproteina u različitim strukturama kože, uključujući i deponovanje u ECM, kako u intaktnoj koži (sl. 4.16), tako i u koži kod supkutane aplikacije različitih hidrogelova, naročito u kapsuli oko implantata i u perikapsularnom vezivnom tkivu.

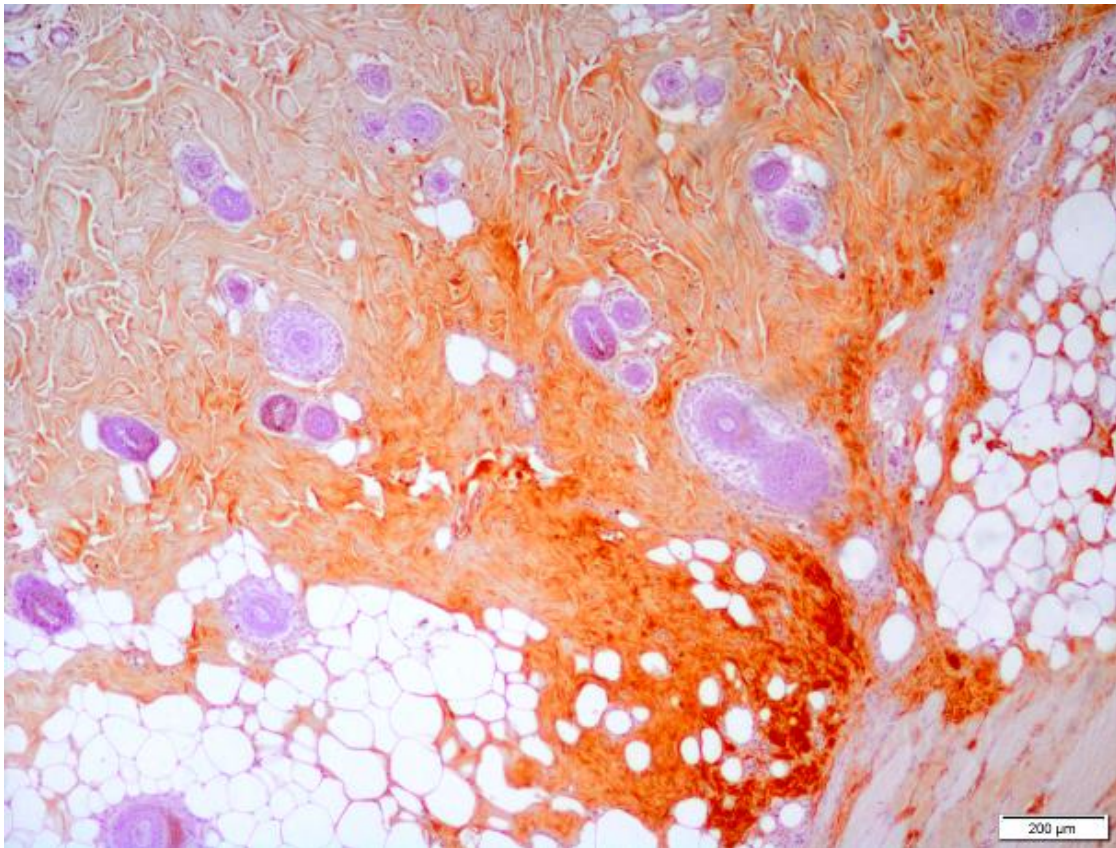
Kolagen I i kolagen III, glavni proteini ECM kože, distribuirani su specifično u različitim histološkim strukturama ovog organa. Imunohistohemijskim bojenjem na kolagen I (Kol I) i kolagen III (Kol III) vizuelizovani su ditribucija ovih proteina u normalnoj intaktnoj koži i koži iz regije incizije (sl. 4.17), kao i promene u ECM kože kod aplikacije različitih hidrogelova, naročito u vezivnotkivnoj kapsuli oko implantata i u periimplantnoj zoni supkutanog vezivnog tkiva koja je u neposrednom kontaktu sa kapsulom (sl. 4.18 i 4.19).

Imunohistohemijskim bojenjem na **CD68** markirani su **makrofagi** u tkivu intaktne kože i u supkutanom vezivnom tkivu (sl. 4.20), kao i u zoni incizione rane (sl. 4.21). Takođe je posmatrana i brojnost makrofaga u vezivnotkivnoj kapsuli formiranoj oko implantata od hidrogelova, kao i periimplantnoj zoni koja se neposredno graniči sa kapsulom (sl. 4.22).

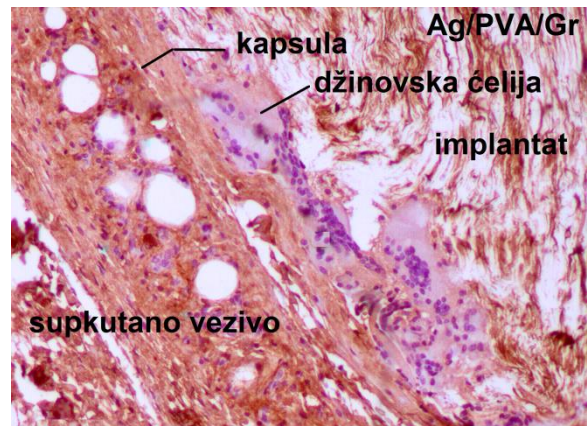
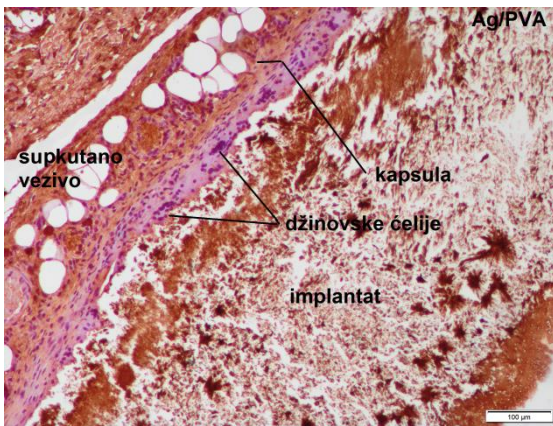
Marker ćelijske proliferacije Ki67 u normalnoj koži eksprimira se u svim ćelijama koje se dele i proliferišu. To su pre svega matične ćelije kože, npr. keratinociti *str. basale* epidermisa (sl. 4.23) i matične ćelije dlačnih folikula (sl. 4.24).



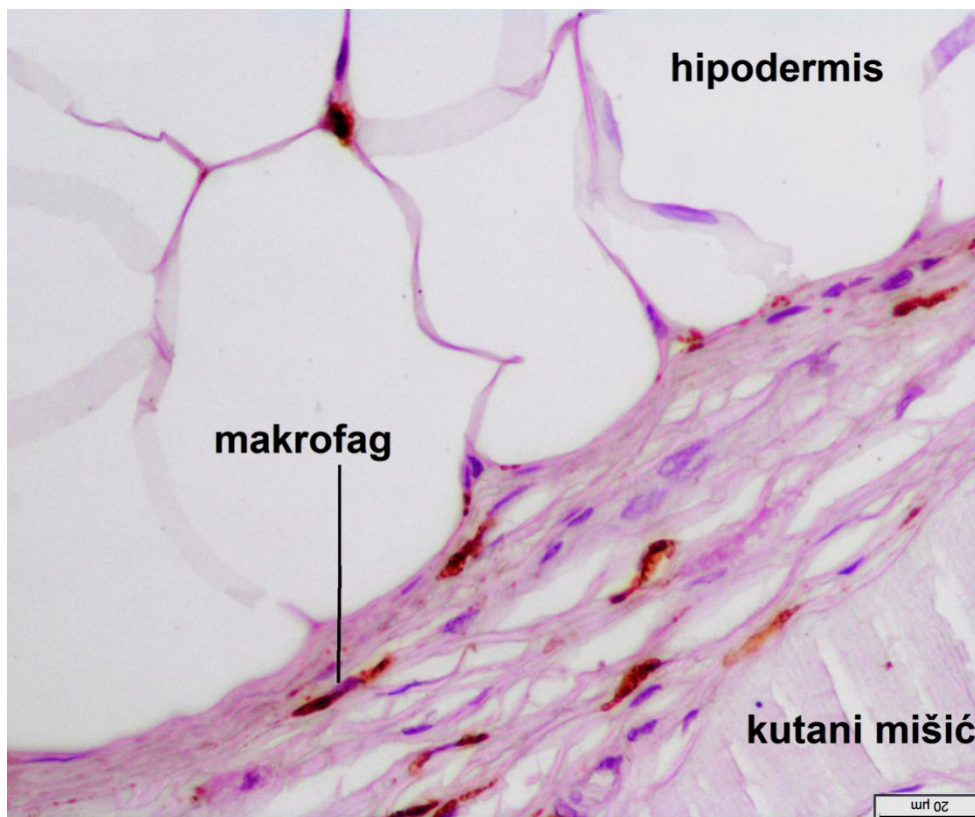
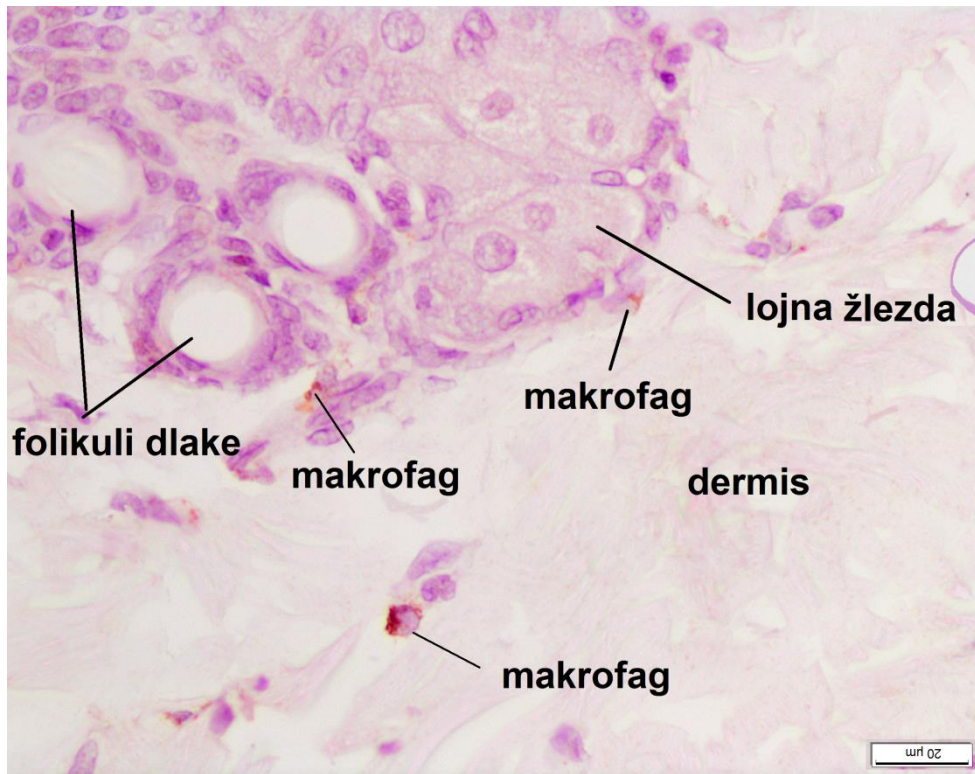
Slika 4.16. Ekspresija laminina u epidermisu, lojnim žlezdama i *m. arrector pili* (A), u zidu arteriole hipodermisa (B), u nervnom fascikulusu (C) i kutanom mišiću (B i C) u intaktnoj koži pacova iz kontrolne grupe. IHH bojenje na laminin (smeđa reakcija), A-bar:100μm; B i C-bar:20μm.



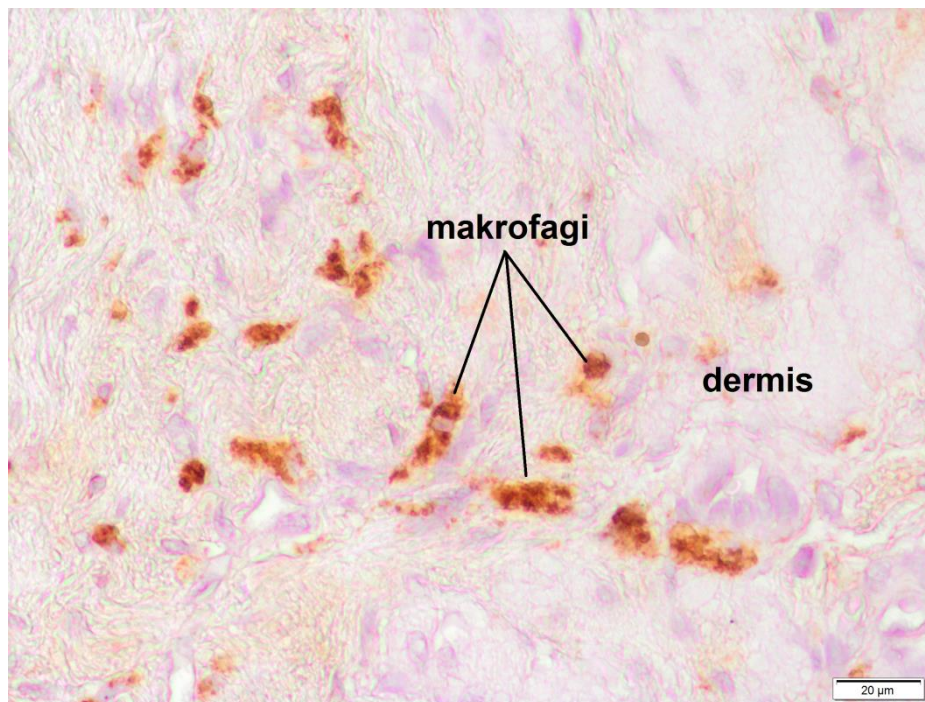
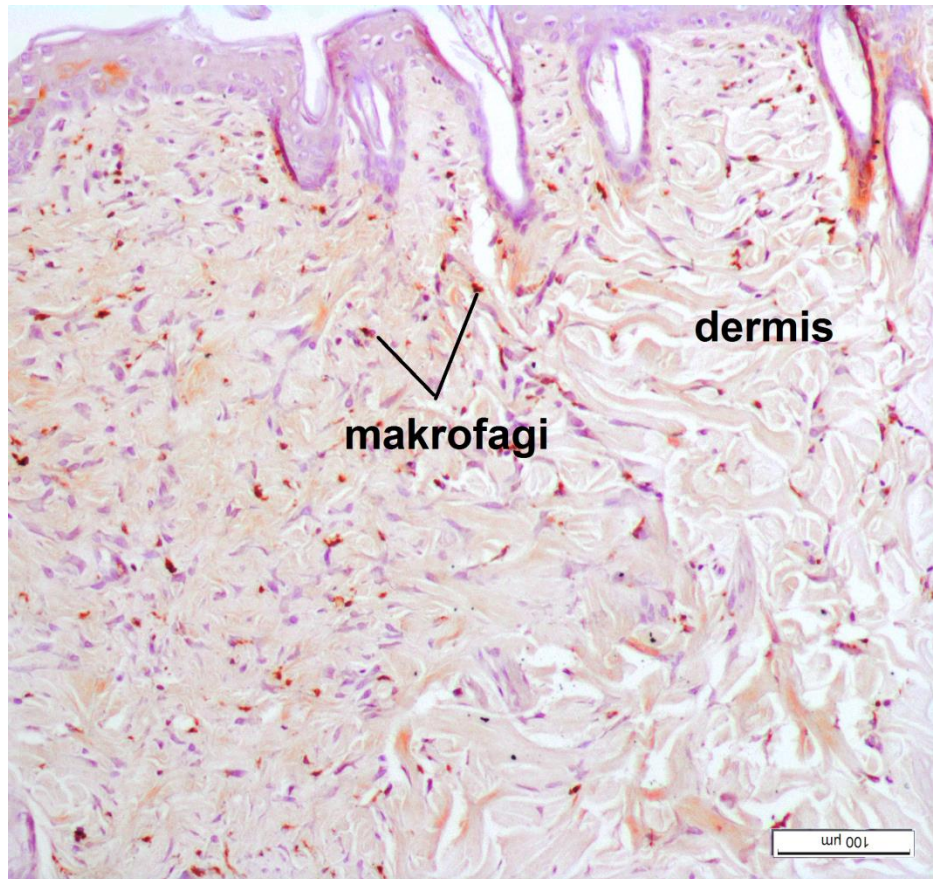
Slika 4.17. Ekspresija kolagena tipa I u koži u zoni hirurške incizije. IHH bojenje (reakcija je smeđa). bar:200μm.



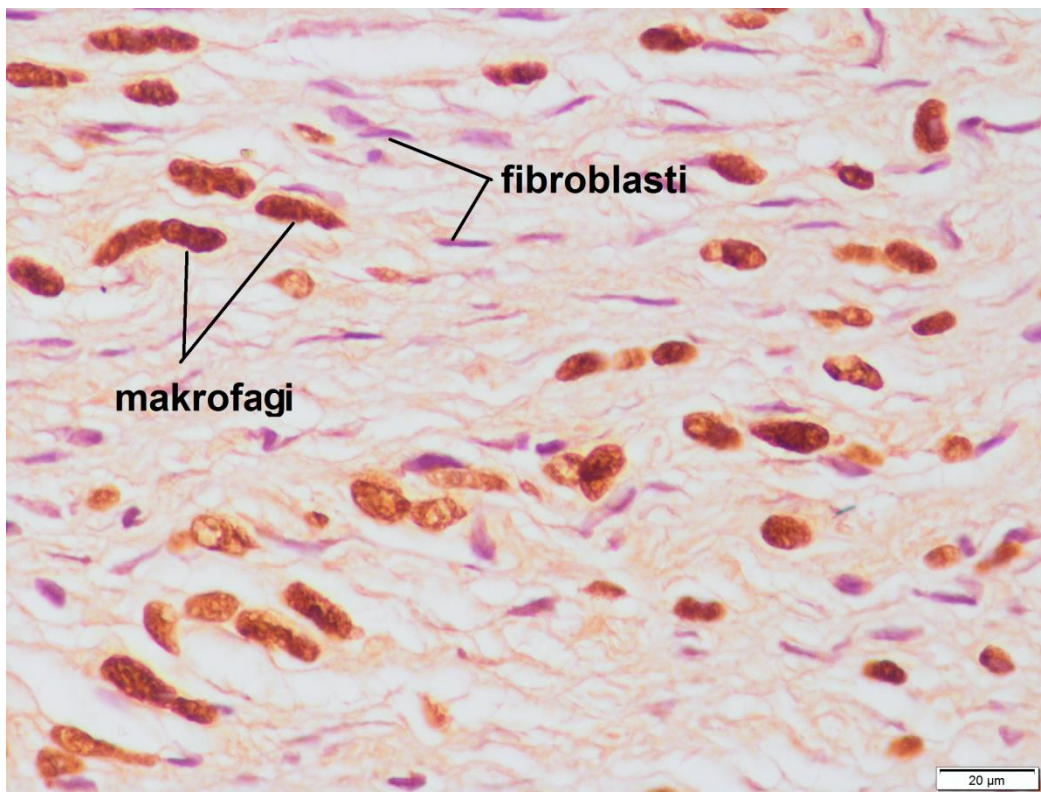
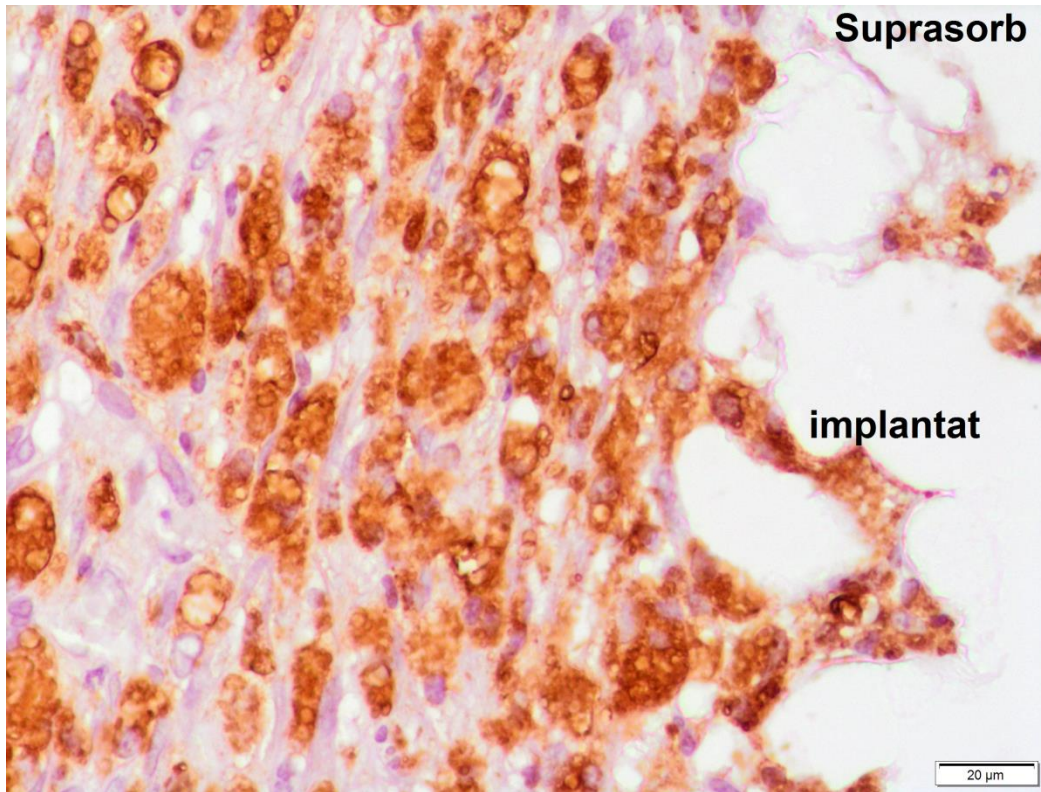
Slike 4.18 i 4.19. Ekspresija kolagena tipa III u vezivnotkivnoj kapsuli oko implantata od Ag/PVA (sl. 4.18, levo) i Ag/PVA/Gr (sl. 4.19, desno) i perikapsularnom supkutano vezivnom tkivu. IHH bojenje (reakcija je smeđa), bar:100μm, slika levo; bar:20μm, slika desno.



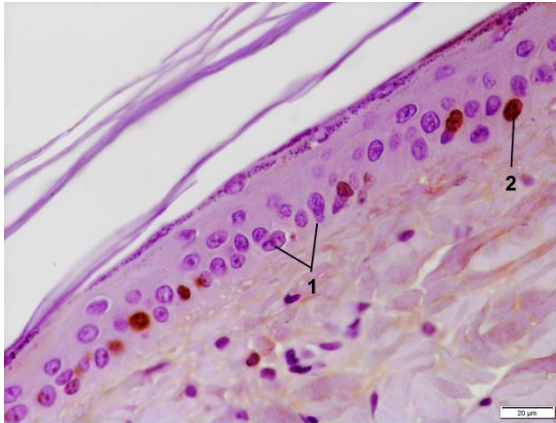
Slika 4.20. Makrofagi u dermisu intaktne kože (gore) i vezivnom tkivu između hipodermisa i kutanog mišića (dole). IHH bojenje na CD68, bar:20μm.



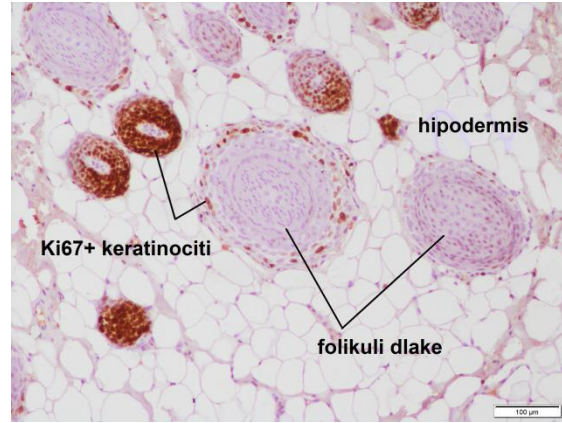
Slika 4.21. Brojni makrofagi u zoni incizivne rane (gore) 30. postoperativnog dana i detalj slike na većem uveličanju (dole). IHH bojenje na CD68, bar:100µm, slika gore; bar:20µm-slika dole.



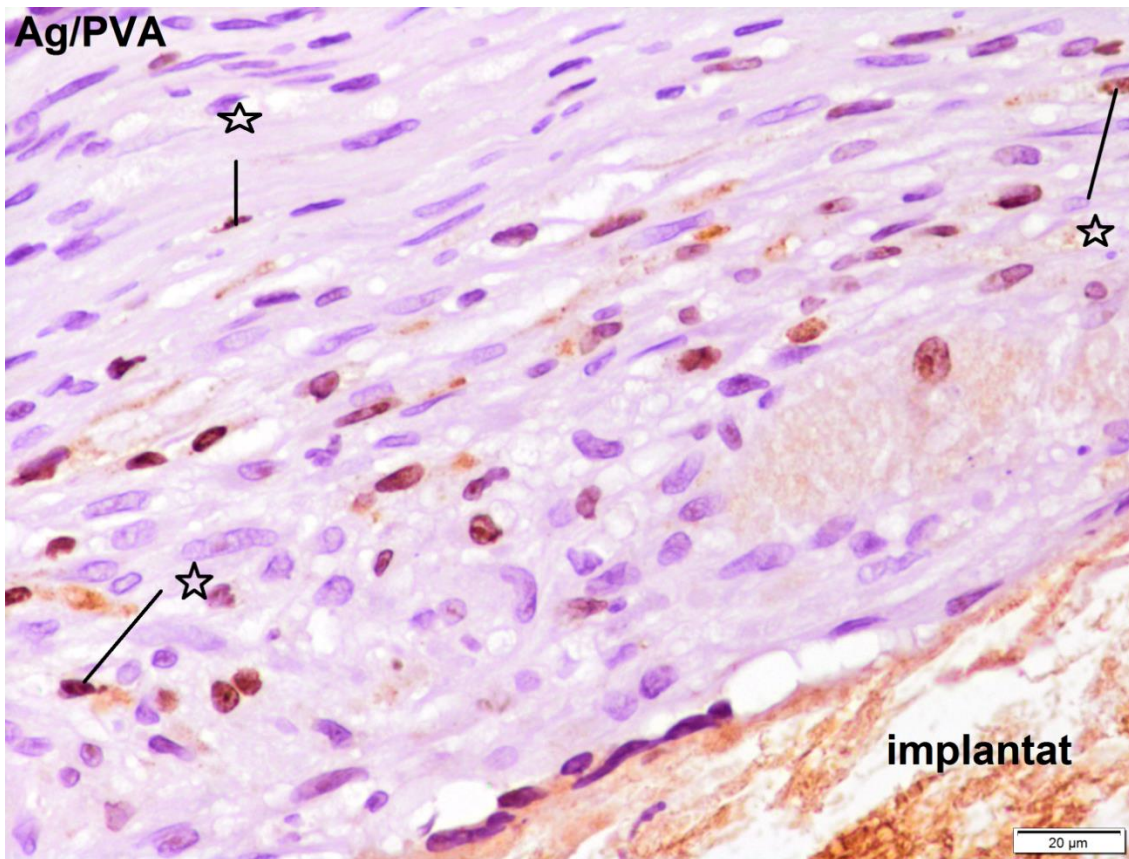
Slika4.22. Makrofagi u kapsuli oko implantiranog Suprasorba, 30. postoperativnog dana (gore) i u supkutanom vezivnom tkivu iz neposredne okoline kapsule (dole) kod istog uzorka. IHH bojenje na CD68, bar:20μm.



Slika 4.23. Ekspresija Ki67 u keratinocitima (2) bazalnog sloja epidermisa (1). IHH bojenje, bar:20μm.



Slika 4.24. Ekspresija Ki67 u keratinocitima dlačnih folikula. IHH bojenje, bar:100μm.



Slika 4.25. Čelije u apoptozi (smeđe obojeni nukleusi, zvezdice) u vezivnotkivnoj kapsuli oko implantata od Ag/PVA, 30. dana nakon implantacije, i supkutanom vezivnom tkivu u neposrednom dodiru sa kapsulom. IHH bojenje na ssDNA, bar:20μm.

Imunohistohemijsko bojenje na **jednolančanu DNK** (*single strand DNA, ssDNA*) omogućava otkrivanje ćelija u različitim stadijumima apoptoze (sl. 4.25), nezavisno od internukleozomalne fragmentacija DNK. Antitelo reaguje specifično sa deoksicitidinom i zahteva dužinu lanca ssDNA od najmanje 25 do 30 baza. Važno

jeistaći da, za razliku od TUNEL [*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*] metode, monoklonsko antitelo na ssDNA, primenjeno u ovoj disertaciji, ne detektuje ćelijsku smrt putem nekroze.

4.5.2. Princip i protokol dvostepene indirektno imunohistohemijske tehnike sa dekstranskim polimernim lancem obeleženim peroksidazom rena (*Thermo Scientific UltraVision LP Detection System/HRP Polymer*)

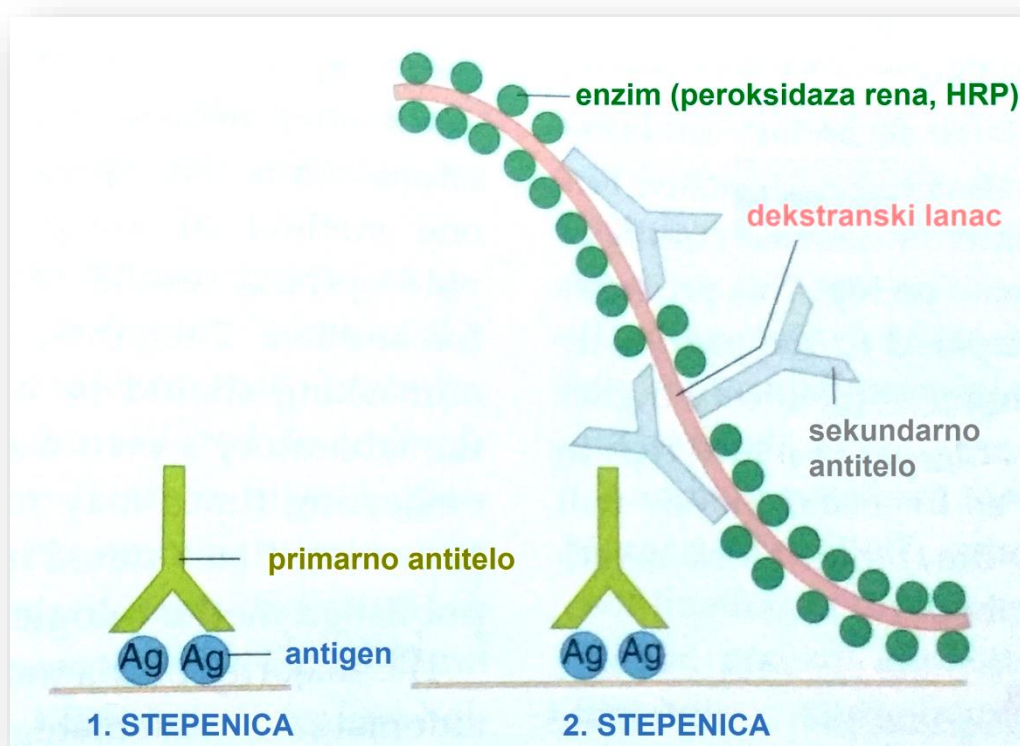
Alfa-glatkomišićni aktin, laminin, kolagen I i III, Ki67 i CD68

Vizuelizacija navedenih markera vršena je primenom visoko senzitivne i specifične dvostepene indirektno imunohistohemijske tehnike u kojoj se koristi dekstranski polimer za koji su direktno vezana sekundarna antitela u velikom broju i koji je obeležen peroksidazom rena (*Thermo Scientific UltraVision LP Detection System/HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, TL-060-HD, Lab Vision, SAD*). Primena ovog polimera eliminiše potrebu za odvojenom aplikacijom vezujućeg antitela i reagensa obeleženog peroksidazom (sl. 4.26) [Suvarna i sar., 2019]. Polimer ne sadrži avidin ili biotin, tako da je nespecifično bojenje, koje je rezultat endogene aktivnosti biotina, značajno smanjeno ili eliminisano.

Demaskiranje antigena primenjeno je nakon uobičajenog procesa deparafinizacije i rehidratacije tkivnih preseka. U toku procesa demaskiranja, prilikom IHH bojenja na laminin, kolagen I i III, Ki67 i CD68, tkivni preseki su izlagani visokoj temperaturi (97⁰C) u toku 20 minuta, u 0,01 M rastvoru citratnog pufera, pH 6 (*Epitope Retrieval Solution, Novocastra, Leica*), u mikrotalasnoj pećnici (700 W). U slučaju IHH bojenja na α -GMA, tkivni preseki su tretirani visokom temperaturom u alkalnom EDTA puferu, pH 10 (*Target Retrieval Solution High pH, EnVision, Dako Co, Danska*), pod istim uslovima. Osnovni cilj koji se postiže demaskiranjem antigena jeste obnavljanje primarne sterične konfiguracije antigena uklanjanjem neželjenih intramolekulskih veza koje nastaju usled formalinske fiksacije i kalupljenja u parafinu, tj. njihovim kidanjem i uklanjanjem kalcijumovih jona [Miller, 2002; Suvarna i sar., 2019].

Nakon demaskiranja antigena, dalji postupak sa tkivnim presecima bio je identičan u slučaju svih aplikovanih primarnih antitela, izuzev kod aplikovanja anti-ssDNA. Demaskiranje antigena pratilo je blokiranje endogene peroksidaze sa 3% vodenim rastvorom vodonik-peroksida tokom 20 min, na sobnoj temperaturi, a zatim su tkivni preseki isprani u fosfatnom puferu i tretirani sa blokirajućim proteinom, tokom

deset minuta, na sobnoj temperaturi. Inkubacija preseka sa primarnim antitelima u odgovarajućim koncentracijama (tabela 4.3) sprovedena je u vlažnoj komori, tokom noći, na 4°C. Kao negativna kontrola služili su preseki koji nisu tretirani primarnim antitelom. Nakon sprovedene inkubacije sa primarnim antitelom, tkivni preseki su ispirani u fosfatnom puferu i inkubirani u rastvoru koji sadrži pojačivač ekspresije primarnog antigena (*Primary Antibody Enhancer*) 10 min na sobnoj temperaturi, a potom isprani i inkubirani u rastvoru dekstranskog polimera na kome su vezana sekundarna antitela i koji je obeležen peroksidazom rena (*HRP Polymer*), 30 min na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju reakcije antigen-antitelo korišćen je kao hromogen 3,3'-diaminobenzidin (*Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako, California, SAD*). Tkivni preseki su kontrastirani Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom (*Merck, Nemačka*), a zatim montirani u medijumu za uklapanje (DPX).



Slika 4.26. Šematski prikaz dvostepene indirektna IHH tehnike sa polimernim lancem obeleženim peroksidazom rena (*modifikovanopo Suvarna K, Layton C, Bancroft JD, 2019*)

Za rastvaranje svih primarnih antiseruma korišćen je komercijalni rastvarač (*Dako Antibody diluent, S0809, Dako, Danska*), a za ispiranje preparata između različitih koraka u toku IHH procedure bojenja korišćen je 0,1 M fosfatni pufer pH 7,4.

Jednolančana DNK (ssDNA)

Prilikom izvođenja IHH reakcije u cilju dokazivanja ssDNA, primenjivan je vrlo specifičan postupak, koji će biti ukratko opisan. Nakon deparafinizacije i rehidratacije, tkivni preseci su inkubirani u rastvoru saponina u fosfatnom puferu (0,1 mg/ml), u toku 20 min, na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi, preseci su inkubirani u 50% vodenom rastvoru formamida, u vodenom kupatilu, na 56⁰C, u toku 20 min, a potom inkubirani u ledenom rastvoru fosfatnog pufera, 5 min. Nakon toga je blokirana endogena peroksidaza inkubacijom u 3% vodenom rastvoru vodonik-peroksida, u toku 5 min, pa su preseci ponovo isprani u destilovanoj vodi. Radi blokiranja nespecifičnog vezivanja antitela, preseci su inkubirani 5 min u 3% vodenom rastvoru bezmasnog mleka u prahu i isprani u destilovanoj vodi. Potom je inkubirano primarno antitelo na sobnoj temperaturi u trajanju od 1h. Dalja procedura IHH bojenja bila je identična kao u slučaju već opisane procedure prilikom bojenja drugih tkivnih markera.

4.5.3. Semikvantitativna procena stepena vaskularizacije, ekspresije laminina i kolagena tipa I i III u koži i zoni oko implantata

Stepen vaskularizacije

Procena stepena vaskularizacije vezivnotkivne kapsule koja okružuje implantate, kao i supkutanog vezivnog tkiva u neposrednoj okolini kapsule, u različitim periodima posmatranja tokom eksperimenta, vršena je na semikvantitativni način, u bod-sistemu od 1+ do 4+: 1+, krvni sudovi zauzimaju do 10% površine posmatrane strukture; 2+, krvni sudovi zauzimaju do 30% površine posmatrane strukture; 3+, krvni sudovi zauzimaju od 31% do 50% površine posmatrane strukture i 4+, krvni sudovi zauzimaju preko 50% površine posmatrane strukture.

Laminin

Imunohistohemijska ekspresija laminina procenjena je semikvantitativno (+, blaga; ++, umerena; +++, izrazita) u svakom od strukturnih elemenata kože i potkožnog tkiva u kojima se eksprimira – u epidermisu, lojnim žlezdama, folikulima dlake, *m. arrector pili*, krvnim sudovima dermisa, stromi dermisa i fibroblastima, hipodermisu i krvnim sudovima hipodermisa i kutanom mišiću. Na osnovu ovakve procene izračunavan je ukupni skor ekspresije laminina u koži i kutanom mišiću. Maksimalni mogući skor, na osnovu ekspresije u svih navedenih 10 strukturnih elemenata, iznosi 30.

Na semikvantitativan način procenjena je i ekspresija laminina u vezivnotkivnoj kapsuli formiranoj oko implantata i u periimplantnom supkutanom vezivnom tkivu, kao blaga (1+), umerena (2+) ili izrazita (3+). Proračunavan je ukupni skor ekspresije laminina u tkivu oko implantata, a maksimalni mogući skor je 6.

Kolagen tipa I i III

Ekspresija kolagena tipa I i III procenjena je u vezivnom tkivu dermisa, hipodermisa i kutanog mišića, na semikvantitativan način, kao i u slučaju procene ekspresije laminina (1+, blaga; 2+, umerena; i 3+, jaka). Na identičan način procenjena je i njihova ekspresija u vezivnotkivnoj kapsuli i u periimplantnom supkutanom vezivnom tkivu.

4.5.4. Određivanje brojnosti makrofaga (CD68 pozitivnih)

Broj makrofaga određivan je u dermisu uzoraka kože sa implantiranim hidrogelovima, u vezivnotkivnoj kapsuli oko implantata i u supkutanom vezivnom tkivu koje neposredno okružuje kapsulu (perikapsularna zona) i izražavan je kao broj CD68⁺-ćelija na mm² površine posmatrane strukture. Ćelije su brojane u pet reprezentativnih područja svakog uzorka. Merenje je vršeno softverskim sistemom *Leica University Suite, version 4,3 (Leicas Microsystems, Nemačka)*, na mikroskopu *Letz Labour Lux S Fluorescence Microscope (Ernst Leitz Wetzlar GMBH, Nemačka)*. Histološki preparati su snimani digitalnim fotoaparatom *Leica DFC295 (Leica, Nemačka)*.

4.5.5. Određivanje brojnosti ćelija u proliferaciji (Ki67pozitivnih)

Ćelije u proliferaciji u intaktnim kontrolnim uzorcima kože, u uzorcima sa incizionom ranom i u uzorcima kože iz zone sa implantiranim hidrogelovima, brojane su u epidermisu i dermisu, kao i u vezivnom tkivu kapsule oko implantata i supkutanom vezivnom tkivu koje neposredno okružuje kapsulu.

U epidermisu su brojani keratinociti u proliferaciji bazalnog sloja i izražavani kao broj Ki67⁺-ćelija na 100 bazalnih keratinocita.

U vezivnotkivnoj kapsuli oko implantiranih hidrogelova, kao i u zoni supkutanog vezivnog tkiva, brojani su fibroblasti u proliferaciji. Ćelije su brojane u pet reprezentativnih područja svakog uzorka, pomoću okularne mrežice površine 0,250 mm², na uvećanju 40x, a brojnost ćelija u proliferaciji izražavana je kao broj Ki67⁺-fibroblasta na 1.000 fibroblasta odgovarajuće strukture.

Sva merenja su vršenana standardnom mikroskopu *Olympus CX31* i obrađena softverom za morfometrijska merenja *CellSens Entry* (*Olympus, Tokio, Japan*). Histološki preparati su snimani digitalnim fotoaparatom *Olympus UC50*.

4.5.6. Određivanje brojnosti apoptotskih ćelija (ssDNA pozitivnih)

Broj apoptotskih ćelija (ssDNA⁺) određivan je na sličan način kao i broj ćelija u proliferaciji (Ki67⁺). Brojane su apoptotske ćelije na 100 keratinocita čitavog epidermisa kože, kao i fibroblasti u apoptozi (ssDNA⁺) u vezivnotkivnoj kapsuli i izražavani su kao broj ssDNA⁺-fibroblasta na 1000 fibroblasta.

4.6. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Od podataka prikupljenih eksperimentalnim istraživanjem formirana je datoteka u statističkom programskom paketu *SPSS 20 (IBM korp.)* uz pomoć kojeg su podaci i analizirani. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. Minimalni nivo statističke značajnosti je ustanovljen na nivou $p < 0,05$.

Primenjene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćene su mere centralne tendencije i mere varijabiliteta, a od analitičkih statističkih metoda korišćena je, u okviru generalnog linearnog modela, analiza varijanse za ponovljena merenja. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ISPITIVANJA PARAMETARA ZA PROCENU TKIVNOG IRITACIONOG INDEKSA

U poglavlju „Materijal i metode” opisan je postupak numeričkog ocenjivanja parametara koji se uzimaju u obzir prilikom izračunavanja indeksa iritacije tkiva (iritacioni indeks, IrI) ukoliko se hidrogelovi implantiraju potkožno. Oni imaju za cilj procenu lokalne reakcije tkiva na mestu gde je implantiran ispitivani materijal. Semikvantitativna procena histoloških promena mekog tkiva (supkutisa) kod pacova sa implantiranim hidrogelovima obuhvatala je: promenu epitela (od normalnog epitela, preko ćelijske degeneracije, metaplazije i fokalnih erozija, do generalizovanih erozija), procenu stepena infiltracije leukocita, prisustvo i stepen vaskularne kongestije i edem. Registrovano je i prisustvo kapsule i njena relativna debljina.

Tabela 5.1. Tkivni iritacioni indeks (IrI) kod supkutane aplikacije hidrogelova.

Merenje	Grupa	\bar{x}	SD	N
1. 7. dan	Ag/PVA	12.92	0.90	12
	Ag/PVA/Gr	10.17	1.03	12
	Suprasorb	7.17	0.83	12
	Zona lažne operacije	9.17	1.03	12
	Ukupno	9.85	2.29	48
2. 15. dan	Ag/PVA	10.08	1.51	12
	Ag/PVA/Gr	10.00	1.21	12
	Suprasorb	6.17	1.11	12
	Zona lažne operacije	11.00	1.65	12
	Ukupno	9.31	2.31	48
3. 30. dan	Ag/PVA	8.00	1.21	12
	Ag/PVA/Gr	10.08	1.16	12
	Suprasorb	7.08	0.90	12
	Zona lažne operacije	9.00	0.95	12
	Ukupno	8.54	1.53	48
4. 60. dan	Ag/PVA	5.00	1.21	12
	Ag/PVA/Gr	5.17	1.40	12
	Suprasorb	5.08	0.79	12
	Zona lažne operacije	6.08	1.08	12
	Ukupno	5.33	1.19	48

5.1.1. Indeks iritacije tkiva

U tabeli 5.1 date su zbirne prosečne vrednosti IrI za potkožno tkivo prilikom implantacije sva tri hidrogela korišćena u ovom eksperimentu (Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorb), u svim posmatranim terminima – 7, 15, 30. i 60. dana nakon implantacije. Takođe, prikazani su i rezultati IrI za lažno operisanu zonu kože, koja je služila kao kontrolna regija za poređenje promena nastalih u potkožnom tkivu prilikom implantacije hidrogelova.

Tabela 5.2. Tkivni iritacioni indeks (IrI) kod supkutane aplikacije hidrogelova–analiza varijanse.

Eksperimentalne grupe	Iritacioni indeks (IrI)* (X±SD)			
	7. dan*	15. dan	30. dan	60. dan
Ag/PVA**	12,92 ± 0,90	10,08 ± 1,51	8,00 ± 1,21	5,00 ± 1,21
Ag/PVA/Gr	10,17 ± 1,03	10,00 ± 1,21	10,08 ± 1,16	5,17 ± 1,21
Suprasorb	7,17 ± 0,83	6,17 ± 1,11	7,08 ± 0,90	5,08 ± 0,79
Zona lažne operacije	9,17 ± 1,03	11,00 ± 1,65	9,00 ± 0,95	6,08 ± 1,08

*F_{merenje}= 144,014; p < 0,001, **F_{hidrogel}= 65,004; p < 0,001, F_{merenje+hidrogelovi}= 17,295; p < 0,001.

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima **iritacionog indeksa potkožnog tkiva** kod primene hidrogelova, kako u zavisnosti od posmatranog perioda nakon implantacije (po faktoru „merenje“ - F_{merenje}= 144,014; p = 0,001), tako i u zavisnosti od vrste implantiranih hidrogelova (faktor „vrsta hidrogelova“ - F_{hidrogel}= 65,004; p < 0,001) i u interakciji oba faktora (F_{merenje+hidrogelovi}= 17,295; p < 0,001) (tabela 5.2).

Višestruka poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa potkožnog tkiva prilikom implantacije hidrogelova tokom vremena, unutar grupa, u zavisnosti od vrste implantiranog hidrogela, prikazana je u tabeli 5.3. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa potkožnog tkiva kod implantacije različitih hidrogelova, u četiri merenja tokom eksperimenta (1=7. dan; 2=15. dan; 3=30. dan i 4=60. dan), prikazana su u tabeli 5.4. Kretanje iritacionog indeksa potkožnog tkiva pri aplikaciji različitih hidrogelova tokom eksperimentalnog perioda prikazano je grafički (grafikon 5.1).

Prilikom potkožne **aplikacije hidrogela Ag/PVA** tkivo je odmah, 7. dana nakon implantacije ovog hidrogela, odgovorilo umerenim stepenom iritacije (12,92 ± 0,90), da bi se tokom perioda praćenja u 15. danu (10,08 ± 1,51), 30. danu (8,00 ± 1,21). i 60.

danu ($5,00 \pm 1,21$) nakon implantacije IrI tkiva linearno smanjivao, što je bilo statistički značajno između svih posmatranih perioda (tabele 5.2 i 5.3).

Tabela 5.3. Višestruka poređenja Sidakovim testom IrI potkožnog tkiva prilikom implantacije hidrogelova tokom vremena, unutar grupa, u zavisnosti od vrste implantiranog hidrogela.

Grupa	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	p
Ag/PVA	1*	2	2.83	<0.001
		3	4.92	<0.001
		4	7.92	<0.001
	2	3	2.08	0.002
		4	5.08	<0.001
	3	4	3.00	<0.001
Ag/PVA/Gr	1	2	0.17	0.999
		3	0.08	1.000
		4	5.00	<0.001
	2	3	-0.08	1.000
		4	4.83	<0.001
	3	4	4.92	<0.001
Suprasorb	1	2	1.00	0.183
		3	0.08	1.000
		4	2.08	<0.001
	2	3	-0.92	0.452
		4	1.08	0.291
	3	4	2.00	<0.001
Zona lažne operacije	1	2	-1.83	0.001
		3	0.17	0.999
		4	3.08	<0.001
	2	3	2.00	0.003
		4	4.92	<0.001
	3	4	2.92	<0.001

*Legenda: I period – 7. dan; II period – 15. dan; III period – 30. dan; IV period – 60. dan.

Prilikom potkožne **aplikacije hidrogela Ag/PVA/Gr** registrovan je sličan, umereni iritacioni indeks u prva tri termina praćenja ($10,17 \pm 1,03$; $10,00 \pm 1,21$; $10,08 \pm 1,16$; za 7, 15. i 30. dan praćenja) i značajan pad IrI 60. postoperativnog dana ($5,17 \pm 1,40$), što je bilo statistički značajno u odnosu na prethodne termine. (tabele 5.2 i 5.3).

Prilikom potkožne **aplikacije Suprasorba** registrovan je blagi iritacioni indeks u svim posmatranim eksperimentalnim terminima ($7,17 \pm 0,83$; $6,17 \pm 1,11$; $7,08 \pm 0,90$ i $5,08 \pm 0,79$; za 7, 15, 30. i 60. postoperativni dan). Potrebno je zapaziti određene oscilacije u kretanju vrednosti IrI u prva tri termina posmatranja, s obzirom da se 30. postoperativnog dana vrednost iritacionog indeksa, nakon pada 15. dana, ponovo vratila na početne vrednosti. Međutim, statistička analiza je pokazala da je pad vrednosti IrI u poslednjem terminu posmatranja (60. dana nakon aplikacije Suprasorba) bio značajno veći u odnosu na sve prethodno posmatrane termine (tabele 5.2 i 5.3).

U **zoni lažne operacije** najveća iritacija tkiva bila je 15. dana nakon operacije, da bi se potom progresivno smanjivala sve do kraja posmatranog eksperimentalnog perioda. Statistička analiza je pokazala da je na kraju posmatranog perioda došlo do značajnog pada vrednosti IrI u odnosu na sve prethodno posmatrane periode (tabele 5.2 i 5.3).

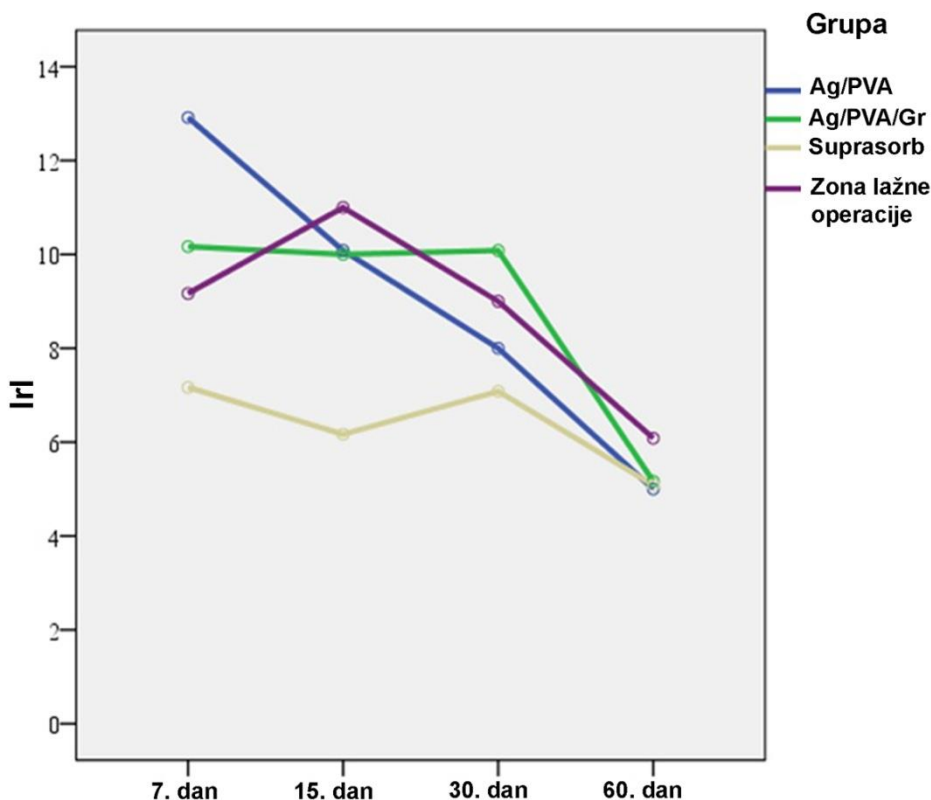
Statistička poređenja IrI **između grupa životinja kojima su implantirani različiti hidrogelovi, tokom vremenskih perioda praćenja nakon operacije**, pokazala su da je svaki od implantiranih hidrogelova imao najjači odgovor tkiva na biomaterijale („pik” odgovora) u određenom vremenskom terminu nakon aplikacije, kao i svoj „dinamički obrazac” odgovora tkiva na implantirani materijal (tabela 5.4 i grafikon 5.1). Iz prikazanih rezultata se vidi da je najjači odgovor na aplikovane biomaterijale ili na lažni operativni zahva, 7. dana nakon aplikacije bio u slučaju aplikacije Ag/PVA, 15. dana u zoni lažne operacije, a 30. dana u supkutanoj zoni, gde je aplikovan Ag/PVA/Gr. U poslednjem terminu posmatranja (60. postoperativni dan) registrovano je statistički značajno smanjenje odgovora tkiva u svim posmatranim grupama. Naime, 60. postoperativnog dana registrovan je blag IrI tkiva, kako u grupama sa aplikovanim Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorbom, tako i u grupi životinja koja je podvrgnuta lažnoj operaciji. U lažno operisanoj regiji na kraju perioda praćenja, 60. postoperativnog dana, takođe je registrovano značajno smanjenje odgovora tkiva na incizionu povredu, slično kao kod implantacije hidrogelova (tabela 5.4. i grafikon 5.1).

Tabela 5.4. Međugrupna poređenja Sidakovim testom IrI potkožnog tkiva kod implantacije različitih hidrogelova, u četiri merenja tokom eksperimenta.

Merenje	(I) Grupa	(J) Grupa	Prosečna razlika (I-J)	P
1. 7. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	2.75	<0.001
		Suprasorb	5.75	<0.001
			3.75	<0.001
	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	3.00	<0.001
		Zona lažne operacije	1.00	0.079
	Suprasorb	Pseudooperated region	-2.00	<0.001
2. 15. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	0.08	1.000
		Suprasorb	3.92	<0.001
		Zona lažne operacije	-0.92	0.511
	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	3.83	<0.001
		Zona lažne operacije	-1.00	0.410
	Suprasorb	Zona lažne operacije	-4.83	<0.001
3. 30. dan	Ag/PVA (A)	Ag/PVA/Gr	-2.08	<0.001
		Suprasorb	0.92	0.220
		Zona lažne operacije	-1.00	0.147
	Ag/PVA/Gr (B)	Suprasorb	3.00	<0.001
		Zona lažne operacije	1.08	0.095
	Suprasorb	Zona lažne operacije	-1.92	<0.001
4. 60. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	-0.17	1.000
		Suprasorb	-0.08	1.000
		Zona lažne operacije	-1.08	0.141
	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	0.08	1.000
		Zona lažne operacije	-0.92	0.292
	Suprasorb	Zona lažne operacije	-1.00	0.206

Uzimajući u obzir numeričke vrednosti IrI kao meru tkivnog odgovora, u smislu minimalnog (1–5), blagog (6–10), umerenog (11–15) ili jakog (16–20), iz prikazanih rezultata se vidi da su svi materijali izazivali blagu iritaciju tkiva u periodu između 7. i 30. dana posmatranja, izuzev Ag/PVA koji je, 7. dana nakon implantacije, doveo do umerene iritacije tkiva. Na kraju posmatranog perioda, 60. postoperativnog dana indeks

iritacije tkiva značajno se smanjivao, a njegova numerička vrednost je ukazivala na minimalnu iritaciju tkiva (grafikon 5.1)



Grafikon 5.1. Kretanje IrI potkožnog tkiva tokom eksperimentalnog perioda kod aplikacije različitih hidrogelova.

5.1.2. Morfološke promene koje određuju vrednost indeksa iritacije tkiva

Prilikom određivanja brojčane vrednosti IrI tkiva u koje su supkutano implantirani hidrogelovi (Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorb), sprovedeno je numeričko ocenjivanje promena u epidermisu, leukocitne infiltracije, vaskularne kongestije, edema i debljine kapsule. Ti rezultati prikazani su u tabelama 5.5 – 5.7. Isto numeričko ocenjivanje tkivnih promena sprovedeno je i u zoni lažne operacije, koja je služila kao kontrolna zona za zonu u kojoj su implantirani hidrogelovi (tabela 5.8).

Tabela 5.5. Semikvantitativna procena histoloških promena u koži i potkožnom tkivu pacova kod kojih je supkutano implantiran Ag/PVA-hidrogel

Reakcija	Numeričko ocenjivanje							
	I period		II period		III period		IV period	
	Ag/PVA-k	Ag/PVA	Ag/PVA-k	Ag/PVA	Ag/PVA-k	Ag/PVA	Ag/PVA-k	Ag/PVA
Epitel								
normalni, intaktni	0		0		0		0	0
ćelijska degeneracija ili stanjivanje				1		1		
hiperplazija		2						
fokalna erozija								
generalizovana erozija								
Leukocitna infiltracija (na velikom uveličanju)								
odsutna	0		0		0		0	
minimalna (manje od 25 ćelija)								1
blaga (26-50 ćelija)						2		
umerena (51-100 ćelija)				3				
izrazita (preko 100 ćelija)		4						
Vaskularna kongestija								
odsutna	0		0		0		0	
minimalna								
blaga						2		
umerena		3		3				3
izrazita, sa pucanjem krvnog suda								
Edem								
odsutan	0		0		0		0	0
minimalan						1		
blagi				2				
umeren		3						
izrazit								
Kapsula								
odsutna	0		0		0		0	
minimalna		1		1				1
tanka						2		
umereno debela								
debela								
Iri	0	13	0	10	0	8	0	5

Legenda: Ag/PVA-k – kontrolni uzorci kože iz okoline implantiranog Ag/PVA; I period – 7. dan; II period – 15. dan; III period – 30. dan; IV period – 60. dan.

Tabela 5.6. Semikvantitativna procena histoloških promena u koži i potkožnom tkivu pacova kod kojih je supkutano implantiran Ag/PVA/Gr-hidrogel.

Reakcija	Numeričko ocenjivanje							
	I period		II period		III period		IV period	
	Ag/PVA/Gr-k	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA/Gr-k	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA/Gr-k	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA/Gr-k	Ag/PVA/Gr
Epitel								
normalni, intaktni	0		0		0		0	
ćelijska degeneracija ili stanjivanje		1		1		1		1
hiperplazija								
fokalna erozija								
generalizovana erozija								
Leukocitna infiltracija (na velikom uvećanju)								
odsutna	0		0		0		0	
minimalna (manje od 25 ćelija)								2
blaga (26-50 ćelija)						3		
umerena (51-100 ćelija)								
izrazita (preko 100 ćelija)		4		4				
Vaskularna kongestija								
odsutna	0		0		0		0	
minimalna								1
blaga				2		2		
umerena		3						
izrazita, sa pucanjem krvnog suda								
Edem								
odsutan	0		0	0	0		0	0
minimalan		1				1		
blagi								
umeren								
izrazit								
Kapsula								
odsutna	0		0		0		0	
minimalna		1						1
tanka								
umereno debela				3		3		
debela								
Iri	0	10	0	10	0	10	0	5

Legenda: Ag/PVA/Gr-k – kontrolni uzorci kože iz okoline implantiranog Ag/PVA/Gr; I period – 7. dan; II period – 15. dan; III period – 30. dan; IV period – 60. dan.

Tabela 5.7. Semikvantitativna procena histoloških promena u koži i potkožnom tkivu pacova kod kojih je supkutano implantiran komercijalni Suprasorb-hidrogel.

Reakcija	Numeričko ocenjivanje							
	I period		II period		III period		IV period	
	Suprasorb-k	Suprasorb	Suprasorb-k	Suprasorb	Suprasorb-k	Suprasorb	Suprasorb-k	Suprasorb
Epitel								
normalni, intaktni	0	0	0	0	0	0	0	0
ćelijska degeneracija ili stanjivanje								
hiperplazija								
fokalna erozija								
generalizovana erozija								
Leukocitna infiltracija (na velikom uveličanju)								
odsutna	0		0		0		0	
minimalna (manje od 25 ćelija)						1		1
blaga (26-50 ćelija)		2		2				
umerena (51-100 ćelija)								
izrazita (preko 100 ćelija)								
Vaskularna kongestija								
odsutna	0		0		0		0	
minimalna				1				
blaga						2		2
umerena		3						
izrazita, sa pucanjem krvnog suda								
Edem								
odsutan	0		0		0		0	
minimalan		1						1
blagi				2		2		
umeren								
izrazit								
Kapsula								
odsutna	0		0		0		0	
minimalna		1		1				1
tanka						2		
umereno debela								
debela								
Iri	0	7	0	6	0	7	0	5

Legenda: Suprasorb-k – kontrolni uzorci kože iz okoline implantiranog S; I period – 7. dan; II period – 15. dan; III period – 30. dan; IV period – 60. dan.

Tabela 5.8. Semikvantitativna procena histoloških promena u koži i potkožnom tkivu pacova iz zone lažne operacije

Reakcija	Numeričko ocenjivanje			
	I period	II period	III period	IV period
	K	K	K	K
Epitel				
normalni, intaktni				0
ćelijska degeneracija ili stanjivanje		1		
hiperplazija	2		2	
fokalna erozija				
generalizovana erozija				
Leukocitna infiltracija (na velikom uveličanju)				
odsutna				
minimalna (manje od 25 ćelija)				
blaga (26-50 ćelija)				
umerena (51-100 ćelija)			3	3
izrazita (preko 100 ćelija)	4	4		
Vaskularna kongestija				
odsutna				
minimalna				
blaga	2		2	
umerena		3		3
izrazita, sa pucanjem krvnog suda				
Edem				
odsutan				0
minimalan	1			
blagi			2	
umeren		3		
izrazit				
Kapsula				
odsutna	0	0	0	0
minimalna				
tanka				
umereno debela				
debela				
Iri	9	11	9	6

Legenda: K - zona lažne operacije; I period – 7. dan; II period – 15. dan; III period – 30. dan; IV period – 60. dan.

Broj leukocita u periimplantnoj zoni

Pored semikvantitativne procene leukocitne infiltracije, određivan je i konkretan broj leukocita (Le) na mm² periimplantne zone kod svakog od aplikovanih hidrogelova (tabela 5.9). Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna razlika u gustini Le infiltracije, prikazane kroz vrednost broja Le/mm² tkiva periimplantne zone, kod primene hidrogelova, kako u zavisnosti od posmatranog perioda nakon implantacije (po faktoru „merenje“ - $F_{\text{merenje}} = 321,264$; $p < 0,001$), tako i u zavisnosti od vrste implantiranih hidrogelova (faktor „vrsta hidrogelova“ - $F_{\text{hidrogel}} = 291,702$; $p < 0,001$) i u interakciji oba faktora ($F_{\text{merenje+hidrogelovi}} = 24,889$; $p < 0,001$).

Tabela 5.9. Broj leukocita u periimplantnoj zoni kod supkutane aplikacije hidrogelova—analiza varijanse.

Eksperimentalne grupe	Leukocitna infiltracija u periimplantnoj zoni: broj leukocita/mm ² (X±SD)			
	7. dan*	15. dan	30. dan	60. dan
Ag/PVA**	147,00±9,48	83,60±8,56	45,30±7,12	18,20±4,42
Ag/PVA/Gr	139,40±16,74	106,90±28,85	61,80±8,50	38,40±7,86
Suprasorb	50,20±15,59	31,80±11,08	21,70±10,11	10,60±4,88
Zona lažne operacije	168,00±42,83	186,40±53,61	92,70±22,22	58,55±8,20

* $F_{\text{merenje}} = 327,264$; $p < 0,000$; ** $F_{\text{hidrogel}} = 291,702$; $p < 0,000$; $F_{\text{merenje+hidrogelovi}} = 24,889$; $p < 0,001$.

Višestruka poređenja Sidakovim testom gustine Le infiltracije u periimplantnoj zoni prilikom potkožne aplikacije hidrogelova tokom vremena, unutar grupa, u zavisnosti od vrste implantiranog hidrogela, prikazana su u tabeli 5.10. Rezultati su pokazali da je aplikacija hidrogelova, bez obzira na vrstu hidrogela, dovela do najveće Le infiltracije periimplantne zone neposredno nakon implantacije, 7. postoperativnog dana, i da se tokom čitavog vremena praćenja, sve do 60. dana, linearno smanjivala. To smanjenje broja Le u periimplantnoj zoni bilo je statistički značajno između svih posmatranih perioda u slučaju primene Ag/PVA i Ag/PVA/Gr. U slučaju aplikacije Suprasorba, do statistički značajnog smanjenja broja Le došlo je nakon 30. i 60. postoperativnog dana. U pogledu broja Le u zoni lažne operacije, taj broj je bio izuzetno

visok 7. i 15. dana nakon operacije, a zatim se, slično kao kod implantacije hidrogelova, statistički značajno smanjivao 30. i 60. postimplantacionog dana, u poređenju sa prethodnim terminima praćenja (tabela 5.10).

Tabela 5.10. Višestruka poređenja Sidakovim testom broja leukocita u periimplantnoj zoni tokom vremena, unutar grupa, u zavisnosti od vrste implantiranog hidrogela.

Vrsta implantata	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika(I-J)	p
Ag/PVA	1*	2	63.400	<0.001
		3	101.700	<0.001
		4	128.800	<0.001
	2	3	38.300	<0.001
		4	65.400	<0.001
		3	4	27.100
Ag/PVA/Gr	1	2	32.500	0.002
		3	77.600	<0.001
		4	101.000	<0.001
	2	3	45.100	<0.001
		4	68.500	<0.001
		3	4	23.400
Suprasorb	1	2	18.400	0.185
		3	28.500	<0.001
		4	39.600	<0.001
	2	3	10.100	0.725
		4	21.200	0.030
		3	4	11.100
Zona lažne operacije	1	2	-18.400	0.185
		3	75.300	<0.001
		4	109.450	<0.001
	2	3	93.700	<0.001
		4	127.850	<0.001
		3	4	34.150

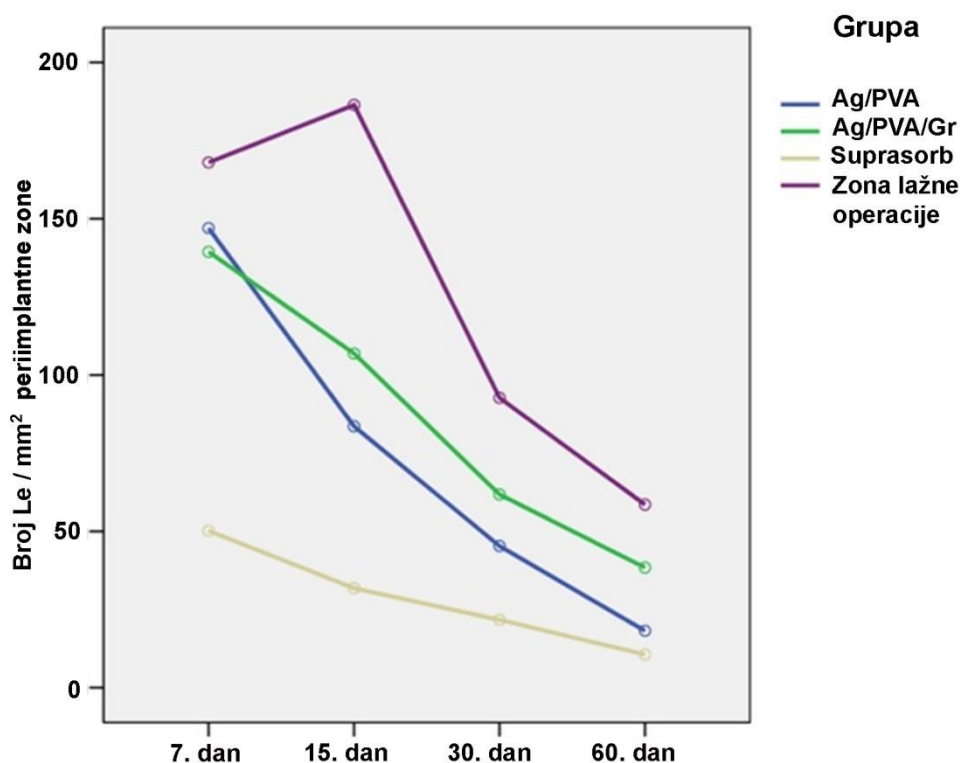
*Legenda: 1 – 7 dan; 2 – 15. dan; 3 – 30. dan; 4 – 60. dan.

Međugrupna poređenja Sidakovim testom Le infiltracije periimplantne zone kod potkožne aplikacije različitih hidrogelova, u četiri termina merenja tokom eksperimenta, prikazana su u tabeli 5.11. Dinamičke promene u gustini Le infiltracije periimplantne zone pri supkutanoj aplikaciji različitih hidrogelova tokom eksperimentalnog perioda, prikazane su grafički (grafikon 5.2).

Tabela 5.11. Međugrupna poređenja Sidakovim testom broja leukocita u periimplantnoj zoni kod implantacije različitih hidrogelova, u četiri perioda merenja tokom eksperimenta.

Merenje	(I) Vrsta implantata	(J) Vrsta implantata	Prosečna razlika(I-J)	p
1. 7. dan	Ag/PVA	B	7.60	0.913
		S	96.80	<0.001
		K	-21.00	0.052
	Ag/PVA/Gr	S	89.20	<0.001
		K	-28.60	0.003
	Supersorb	K	-117.80	<0.001
2. 15. dan	Ag/PVA	B	-23.30	0.119
		S	51.80	<0.001
		K	-102.80	<0.001
	Ag/PVA/Gr	S	75.10	<0.001
		K	-79.50	<0.001
	Suprasorb	K	-154.60	<0.001
3. 30. dan	Ag/PVA	B	-16.50	0.001
		S	23.60	<0.001
		K	-47.40	<0.001
	Ag/PVA/Gr	S	40.10	<0.001
		K	-30.90	<0.001
	Suprasorb	K	-71.00	<0.001
4. 60. dan	Ag/PVA	B	-20.20	<0.001
		S	7.60	0.003
		K	-40.35	<0.001
	Ag/PVA/Gr	S	27.80	<0.001
		K	-20.15	<0.001
	Suprasorb	K	-47.95	<0.001

U prvom terminu praćenja, 7. postoperativnog dana, najveći broj Le zabeležen je u zoni lažne operacije, dok je u periimplantnoj zoni oko Ag/PVA i Ag/PVA/Gr taj broj sličan i nešto manji u odnosu na lažno operisanu zonu. Međutim, tokom daljeg perioda praćenja, kod implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, i pored linearnog smanjenja broja Le sve do kraja eksperimenta, to smanjenje bilo je statistički značajno veće 30. i 60. postoperativnog dana u grupi životinja kojoj je implantiran Ag/PVA, u odnosu na aplikaciju Ag/PVA/Gr. U slučaju implantacije Suprasorba broj Le je u svim ispitivanim terminima nakon implantacije ovog komercijalnog hidrogela bio manji u poređenju sa implantacijom kako drugih hidrogelova (Ag/PVA i AgPVA/Gr), tako i u poređenju sa zonom lažne operacije (tabela 5.11 i grafikon 5.2).



Grafikon 5.2. Dinamička promena broja leukocita tokom eksperimentalnog perioda u periimplantnoj zoni kod aplikacije različitih hidrogelova.

Debljina vezivnotkivne kapsule oko implantata

Rezultati merenja debljine vezivnotkivne kapsule oko implantata, kao i rezultati analize varijanse za ponovljena merenja, prikazani su u tabeli 5.12.

Tabela 5.12. Debljina vezivnotkivne kapsule formirane oko implantata kod supkutane aplikacije hidrogelova—analiza varijanse.

Vrsta hidrogela	Debljina vezivnotkivne kapsule (μm), ($X \pm SD$)			
	7. dan*	15. dan	30. dan	60. dan
Ag/PVA**	9,94 \pm 2,72	11,11 \pm 8,82	99,55 \pm 37,45	57,49 \pm 15,90
Ag/PVA/Gr	26,48 \pm 20,30	161,56 \pm 663,04	180,65 \pm 104,82	69,58 \pm 14,69
Suprasorb	20,10 \pm 3,61	45,10 \pm 79,78	129,61 \pm 34,80	33,97 \pm 19,63

* $F_{\text{merenje}} = 4,333$; $p = 0,05$; ** $F_{\text{hidrogel}} = 3,256$; $p = 0,033$; $F_{\text{merenje+hidrogelovi}} = 0,712$; $p = 0,640$.

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je statistički značajna razlika u debljini vezivnotkivne kapsule formirane oko implantata u zavisnosti od posmatranog perioda nakon implantacije (po faktoru „merenje“ - $F_{\text{merenje}} = 4,333$; $p =$

0,05), kao i u zavisnosti od vrste implantiranih hidrogelova (faktor „vrsta hidrogelova“ - $F_{\text{hidrogel}} = 3,256$; $p = 0,033$), ali ne i u interakciji oba faktora ($F_{\text{merenje+hidrogelovi}} = 0,712$; $p = 0,640$).

Tabela 5.13. Višestruka poređenja Sidakovim testom debljine vezivnotkivne kapsule oko implantata tokom vremena, unutar eksperimentalnih grupa, u zavisnosti od vrste implantiranog hidrogela.

Vrsta implantata	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika(I-J)	p
Ag/PVA	1*	2	-11.18	1.000
		3	-89.61	<0.001
		4	-47.56	<0.001
	2	3	-78.44	0.896
		4	-36.38	0.997
		3	4	42.06
Ag/PVA/Gr	1	2	-135.08	0.365
		3	-154.17	<0.001
		4	-43.09	<0.001
	2	3	-19.09	1.000
		4	91.99	0.777
		3	4	111.08
Suprasorb	1	2	-25.00	1.000
		3	-109.50	<0.001
		4	-13.87	0.016
	2	3	-84.50	0.941
		4	11.13	1.000
		3	4	95.64

*Legenda: 1 – 7 dan; 2 – 15. dan; 3 – 30. dan; 4 – 60. dan.

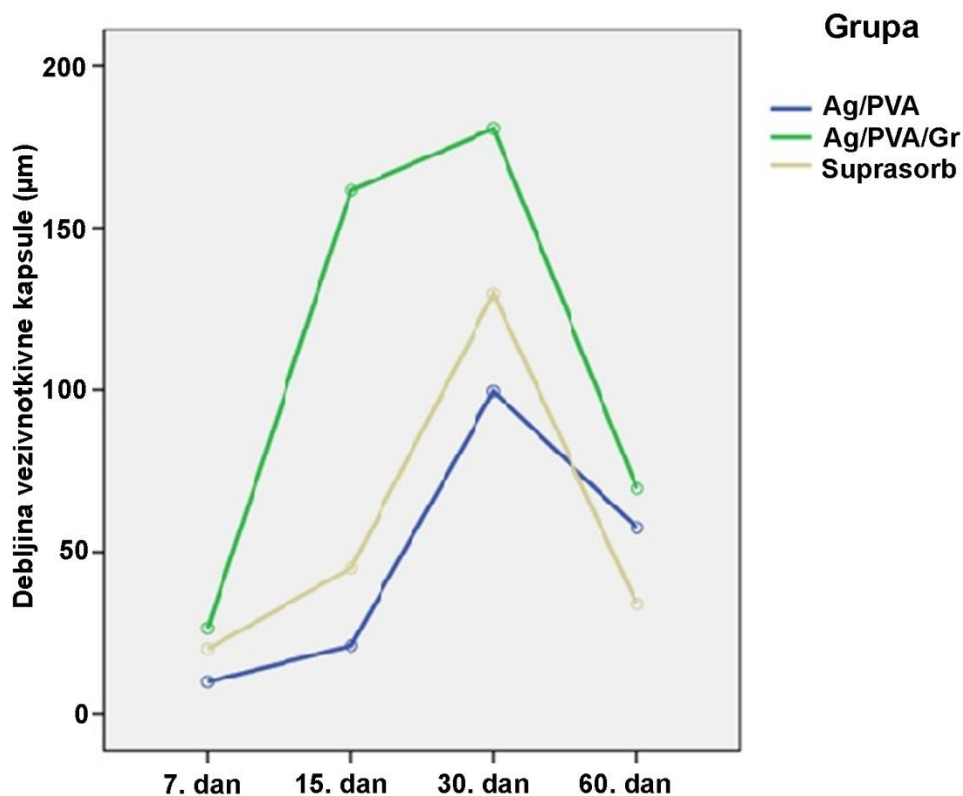
Rezultati dinamičke promene debljine vezivnotkivne kapsule, tokom vremena, u zavisnosti od vrste potkožno implantiranog hidrogela (grafikon 5.3), pokazali su da se debljina kapsule linearno povećavala od 7. do 30. postoperativnog dana kod svih aplikovanih hidrogelova i da se, potom, značajno smanjila 60. postoperativnog dana. Povećanje debljine kapsule između 7. i 30. postoperativnog dana, u slučaju svih primenjenih hidrogelova, bilo je visoko statistički značajno, kao i njeno smanjenje između 30. i 60. postoperativnog dana (tabela 5.13). Takođe, u slučaju svih aplikovanih hidrogelova kapsula je bila statistički značajno tanja 60. dana praćenja u odnosu na vrednosti registrovane 7. dana.

Kapsula koja se formirala oko implantata od Ag/PVA/Gr bila je najdeblja u svim ispitivanim postoperativnim terminima i bila je statistički značajno deblja nego kapsula

formirana oko hidrogela od Ag/PVA 7, 30. i 60. dana nakon implantacije. Debljina kapsule formirane oko implantiranog Suprasorb nalazila se između vrednosti debljine kapsule oko Ag/PVA/Gr i Ag/PVA u prva tri termina praćenja (7, 15. i 30. dana nakon implantacije), ali se 60. postoperativnog dana smanjila na vrednost ispod vrednosti debljine kapsule hidrogelova od Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, i ta razlika bila je statistički visoko značajna. Takođe, 60. postoperativnog dana deblja vezivnotkivna kapsula zadržala se oko implantiranog Ag/PVA/Gr u poređenju sa implantiranim Ag/PVA i ta razlika bila je statistički značajna (tabela 5.14).

Tabela 5.14. Međugrupna poređenja Sidakovim testom debljine vezivnotkivne kapsule oko implantata kod implantacije različitih hidrogelova, u četiri perioda merenja tokom eksperimenta.

Merenje	(I) Vrsta implantata	(J) Vrsta implantata	Prosečna razlika(I-J)	p
1. 7.dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	-16.55	<0.001
		Suprasorb	-10.17	0.023
	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA	16.55	<0.001
		Suprasorb	6.38	0.244
	Suprasorb	Ag/PVA	10.17	0.023
		Ag/PVA/Gr	-6.38	0.244
2. 15. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	-140.45	0.459
		Suprasorb	-23.99	0.996
	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA/Gr	140.45	0.459
		Suprasorb	116.46	0.692
	Suprasorb	Ag/PVA	23.99	0.996
		Ag/PVA/Gr	-116.46	0.692
3. 30. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	-81.10	<0.001
		Suprasorb	-30.06	0.372
	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA	81.10	<0.001
		Suprasorb	51.05	0.042
	Suprasorb	Ag/PVA	30.06	0.372
		Ag/PVA/Gr	-51.05	0.042
4. 60. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	-12.08	0.004
		Suprasorb	23.52	<0.001
	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA	12.08	0.004
		Suprasorb	35.61	<0.001
	Suprasorb	Ag/PVA	-23.52	<0.001
		Ag/PVA/Gr	-35.61	<0.001



Grafikon 5.3. Dinamička promena debljine vezivnotkivne kapsule formirane oko implantata tokom eksperimentalnog perioda kod aplikacije različitih hidrogelova.

5.1.3. Dubina infiltracije leukocita u implantat iz periimplantne zone

Dubina infiltracije Le u implantat iz periimplantne zone kod supkutane aplikacije hidrogelova, kao i rezultati analize varijanse za ponovljena merenja, prikazani su u tabeli 5.15.

Tabela 5.15. Dubina infiltracije Le u implantat iz periimplantne zone, kod supkutane aplikacije hidrogelova—analiza varijanse.

Vrsta implantata	Dubina infiltracije leukocita u implantat (µm) (X±SD)			
	7. dan*	15. dan	30. dan	60. dan
Ag/PVA**	127,63±41,81	34,10±15,46	56,24±30,09	0,00±0,00
Ag/PVA/Gr	123,05±33,52	84,07±43,43	81,98±36,58	24,86±7,06
Suprasorb	0,00±0,00	126,57±48,32	74,35±32,84	0,00±0,00

*F_{merenje}= 107,778; p<0.001; **F_{hidrogel}= 29,223; p<0,001; F_{merenje+hidrogelovi}= 57,462; p< 0,001.

Tabela 5.16. Višestruka poređenja Sidakovim testom dubine infiltracije Le u implantat iz periimplantne zone tokom vremena, unutar eksperimentalnih grupa, u zavisnosti od vrste implantiranog hidrogela.

Vrsta implantata	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika(I-J)	p
Ag/PVA	1*	2	93.53	<0.001
		3	71.39	<0.001
		4	127.63	<0.001
	2	3	-22.14	0.125
		4	34.10	<0.001
	3	4	56.24	<0.001
Ag/PVA/Gr	1	2	38.98	<0.001
		3	41.07	<0.001
		4	98.19	<0.001
	2	3	2.09	1.000
		4	59.21	<0.001
	3	4	57.12	<0.001
Suprasorb	1	2	-126.57	<0.001
		3	-74.35	<0.001
		4	5.68E-14	1.000
	2	3	52.23	<0.001
		4	126.57	<0.001
	3	4	74.35	<0.001

*Legenda: 1 – 7 dan; 2 – 15. dan; 3 – 30. dan; 4 – 60. dan.

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna razlika u dubini infiltracije leukocita iz periimplantne zone u implantat u zavisnosti od posmatranog perioda nakon operacije (po faktoru „merenje“ - $F_{\text{merenje}}=107,778$; $p<0.001$), u zavisnosti od vrste implantiranih hidrogelova (faktor „vrsta hidrogelova“ - $F_{\text{hidrogel}}=29,223$; $p<0,001$), kao i u interakciji oba faktora ($F_{\text{merenje+hidrogelovi}}=57,462$; $p<0,001$).

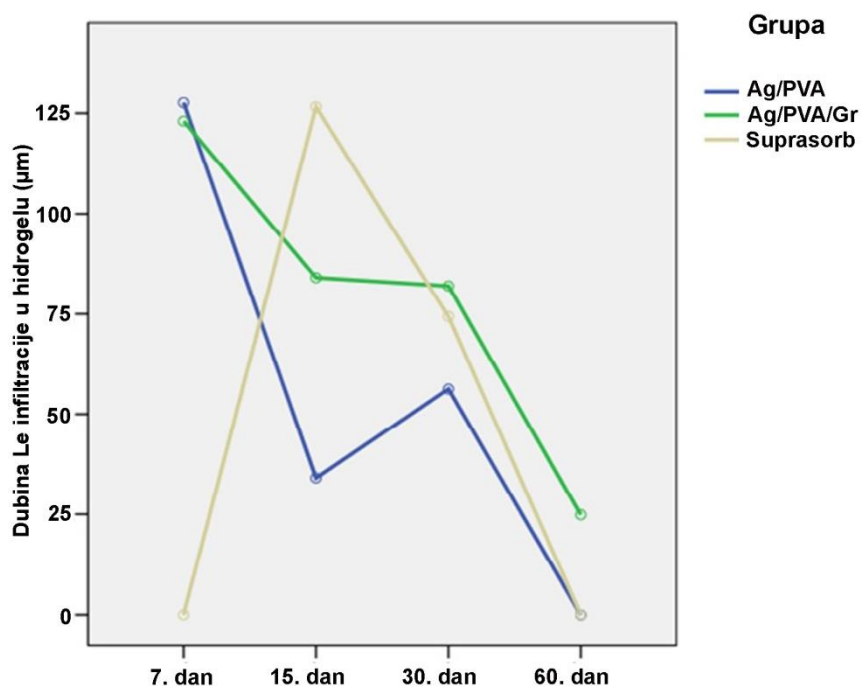
Rezultati dinamičke promene dubine Le infiltracije u implantat iz periimplantne zone tokom vremena, u zavisnosti od vrste potkožno implantiranog hidrogela (grafikon 5.4 i tabela 5.16), pokazali su da je u slučaju aplikovanog Ag/PVA i Ag/PVA/Gr došlo do prodiranja Le u ove hidrogelove do slične dubine (izražene u μm) već 7. postoperativnog dana, da bi se potom dubina Le infiltracije statistički značajno smanjila 15. postoperativnog dana. U 30. postoperativnom danu kod oba primenjena implantata (Ag/PVA i Ag/PVA/Gr) dubina prodora Le u implantat bila je slična kao u prethodnom terminu, da bi 60. postoperativnog dana došlo do statistički značajnog smanjenja ovog

parametra u poređenju sa svim prethodnim terminima praćenja. Potrebno je istaći da u ovom poslednjem terminu praćenja, tj. 60. postoperativnog dana, nije primećen ulazak Le u implantat od Ag/PVA. Međutim, u slučaju aplikovanog Suprasorb, obrazac dubine ulaska leukocita iz periimplantne zone u implantat bio je nešto drugačiji. Naime, 7. postoperativnog dana u ovom hidrogelu nisu primećeni Le, da bi već u sledećem terminu praćenja, 15. postoperativnog dana, bio zabeležen "pik" vrednosti ovog parametra. Nakon toga došlo je do naglog linearnog smanjenja dubine ulaska leukocita u implantat u 30. postoperativnom danu, tj. do potpunog nestanka Le iz implantata u 60. postoperativnom danu. Statističke značajnosti u pogledu vrednosti dubine prodora Le u Suprasorb bile su izrazite između termina u kojima je zabeleženo prisustvo Le u implantatu (grafikon 5.4 i tabela 5.16).

Tabela 5.17. Međugrupna poređenja Sidakovim testom dubine infiltracije leukocita u implantat iz periimplantne zone kod implantacije različitih hidrogelova, u četiri perioda merenja tokom eksperimenta.

Merenje	(I) Vrsta implantata	(J) Vrsta implantata	Prosečna razlika(I-J)	p
1. 7. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	4.587	0.931
		Suprasorb	127.634	<0.001
	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA	-4.587	<0.001
		Suprasorb	123.047	<0.001
	Suprasorb	Ag/PVA	-127.634	<0.001
		Ag/PVA/Gr	-123.047	<0.001
2. 15. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	-49.965	<0.001
		Suprasorb	-92.471	<0.001
	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA	49.965	<0.001
		Suprasorb	-42.505	<0.001
	Suprasorb	Ag/PVA	92.471	<0.001
		Ag/PVA/Gr	42.505	<0.001
3. 30. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	-25.735	0.011
		Suprasorb	-18.103	0.179
	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA	25.735	0.011
		Suprasorb	7.632	0.815
	Suprasorb	Ag/PVA	18.103	0.179
		Ag/PVA/Gr	-7.632	0.815
4. 60. dan	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	-24.860	<0.001
		Suprasorb	1.776E-15	1.000
	Ag/PVA/Gr	Ag/PVA	24.860	<0.001
		Suprasorb	24.860	<0.001
	Suprasorb	Ag/PVA	-1.776E-15	1.000
		Ag/PVA/Gr	-24.860	<0.001

Međugrupna poređenja Sidakovim testom dubine infiltracije leukocita iz periimplantne zone u implantat kod potkožne aplikacije različitih hidrogelova, u četiri perioda merenja tokom eksperimenta, prikazana su u tabeli 5.17. Poređenjem dubine infiltracije Le u Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, može se zaključiti da su u oba hidrogela Le prodrli najdublje 7. postoperativnog dana i u tom terminu vrednost posmatranog parametra bila je skoro identična ($127,63 \pm 41,81 \mu\text{m}$ za Ag/PVA i $123,05 \pm 33,52 \mu\text{m}$ za Ag/PVA/Gr). Međutim, prateći dalji pad vrednosti dubine prodora Le, sve do 60. postoperativnog dana, zapaža se da je on bio veći kod Ag/PVA i da je ta razlika u odnosu na Ag/PVA/Gr bila statistički visoko značajna u svakom od termina posmatranja. Što se tiče aplikacije komercijalnog hidrogela Suprasorb, već je napred istaknuto da 7. i 60. postoperativnog dana u ovom hidrogelu nije zabeleženo prisustvo leukocita. Međutim, dubina ulaska Le u Suprasorb 15. dana posmatranja ($126,57 \pm 48,32 \mu\text{m}$) bila je statistički značajno veća od vrednosti zabeležene u tom terminu za Ag/PVA i Ag/PVA/Gr. U 30. postoperativnom danu dubina ulaska Le u Suprasorb nalazila se između vrednosti za taj parametar dobijene kod aplikacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr. Na kraju perioda posmatranja Le su zapaženi i dalje sa malom dubinom infiltracije ($24,86 \pm 7,06$) samo u slučaju aplikovanog Ag/PVA/Gr (grafikon 5.4 i table 5.15 i 5.17).



Grafikon 5.4. Dinamička promena dubine leukocitne infiltracije u implantat iz periimplantne zone tokom eksperimentalnog perioda kod aplikacije različitih hidrogelova.

5.1.4. Džinovske ćelije tipa oko stranog tela lokalizovane oko supkutanih implantata od različitih hidrogelova

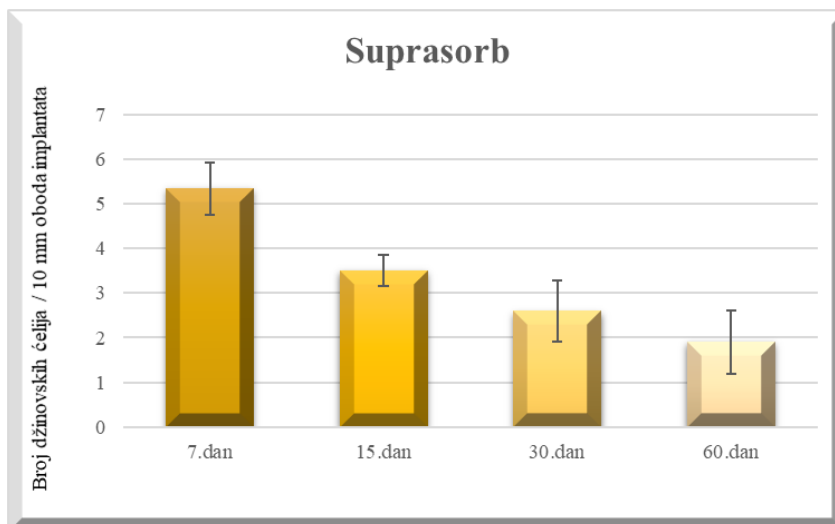
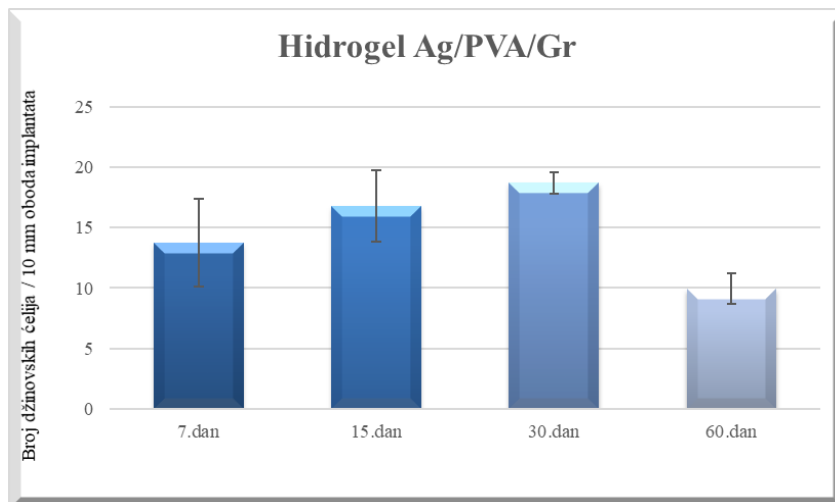
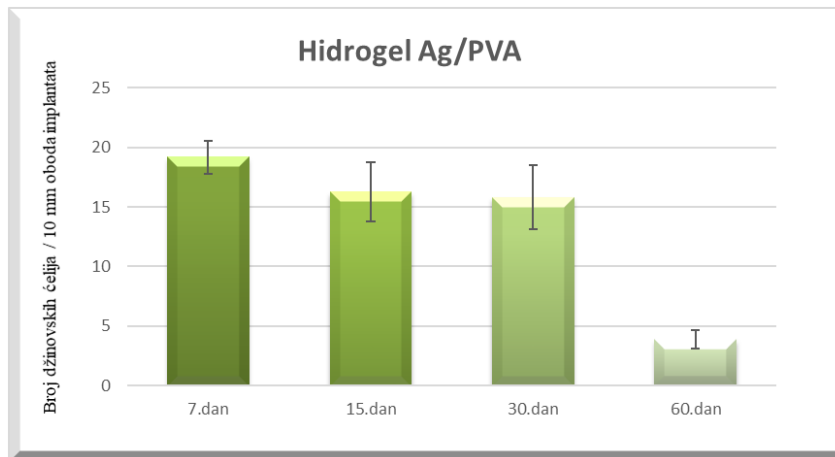
Broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela, lokalizovanih oko supkutano implantiranih hidrogelova (Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suoprasorb) tokom postoperativnog praćenja (7. dan, 15. dan, 30. dan i 60. dan), prikazan je u tabelama 5.18 i 5.19, na grafikonima 5.5, 5.6 i 5.7, kao i na slikama 5.1 do 5.7.

Tabela 5.18. Statistički pokazatelji broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela, lokalizovanih oko supkutano implantiranih hidrogelova, u 7, 15, 30. i 60. postoperativnom danu.

Grupa		Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb
1	X (srednja vrednost, N/10 mm)	19.1690	13.7450	5.3375
	N	20	20	20
	SD (standardna devijacija)	1.35787	3.61349	0.59266
2	X (srednja vrednost, N/10 mm)	16.2535	16.7660	3.5040
	N	20	20	20
	SD (standardna devijacija)	2.50949	2.94098	0.34235
3	X (srednja vrednost, N/10 mm)	15.8070	18.7240	2.5880
	N	20	20	20
	SD (standardna devijacija)	2.70025	.88310	0.68795
4	X (srednja vrednost, N/10 mm)	3.8835	9.9360	1.9030
	N	20	20	20
	SD (standardna devijacija)	0.78217	1.23831	0.70542

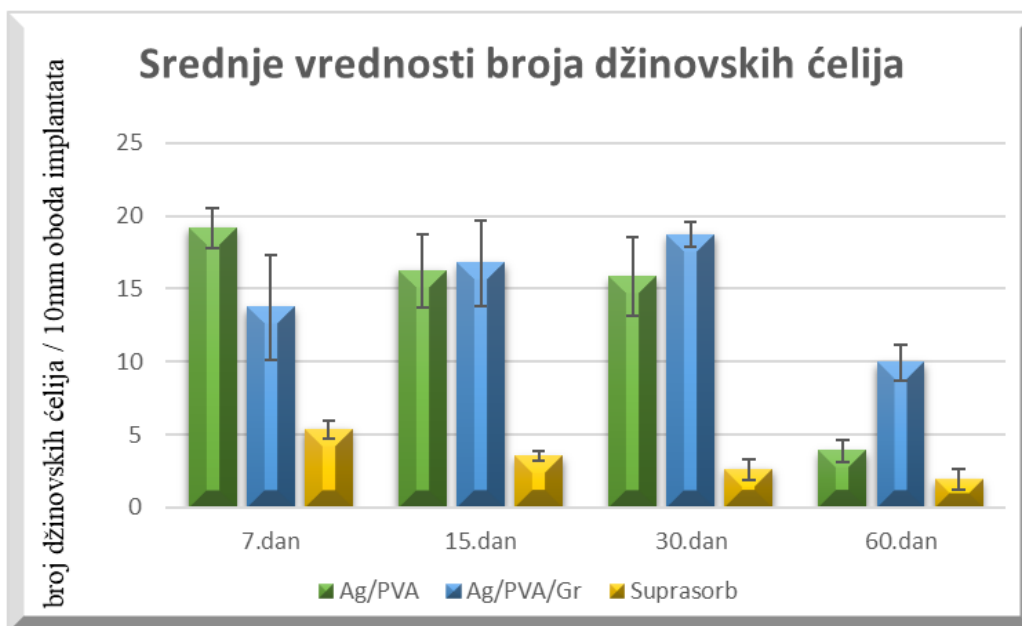
Legenda: 1 – 7. postoperativni dan; 2 – 15. postoperativni dan; 3 – 30. postoperativni dan; 4 – 60. postoperativni dan

Rezultati istraživanja broja džinovskih ćelija lokalizovanih oko implantata i prikazanih kao broj na 10 mm oboda implantata, pokazali su da je broj ovih ćelija bio najveći 7. postoperativnog dana u slučaju aplikacije sva tri hidrogela, a da se potom linearno smanjivao, sve do 60. postoperativnog dana u slučaju implantacije Ag/PVA i Suprasorba.



*F (Ag/PVA)=228.048, $p < 0,001$; F (Ag/PVA/Gr)=48.886, $p < 0,001$; F (Suprasorb)=123.153; $p < 0,001$
(ANOVA, One Way)

Grafikon 5.5. Broj džinovskih ćelija tokom različitih vremena proteklih od implantacije hidrogelova od Ag/PVA (gore), Ag/PVA/Gr (u sredini) i Suprasorba (dole).

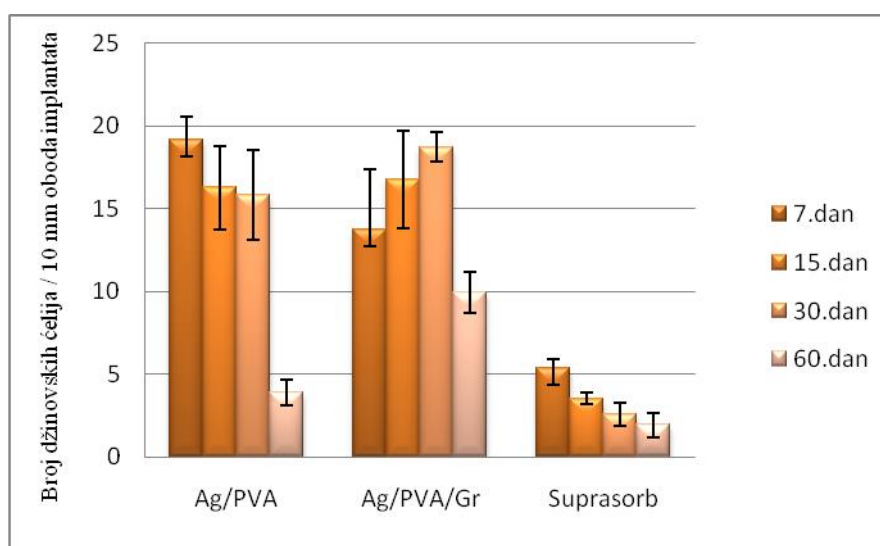


*ANOVA (One Way), između hidrogelova, po periodima praćenja; 7. dan: $F=196,063$, $p<0,001$; 15. dan: $F=224.834$, $p<0.01$; 30. dan: $F= 519,191$, $p<0,001$; 60. dan: 397.622 , $p<0,001$.

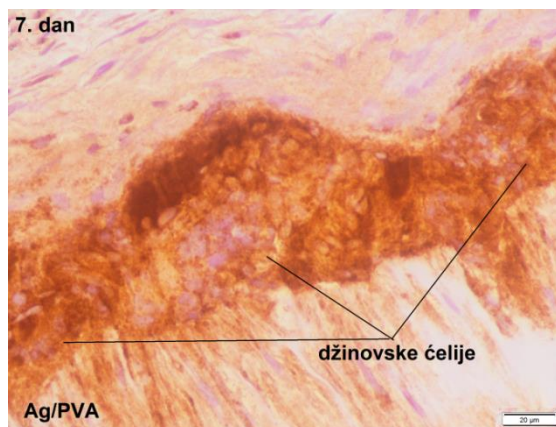
Bonferonijev *post hoc test*:

- 7. dan – Ag/PVA:Ag/PVA/Gr, $p<0,001$; Ag/PVA: Suprasorb, $p<0,001$; Ag/PVA/Gr: Suprasorb, $p<0,01$
- 15. dan – Ag/PVA:Suprasorb, $p<0,001$; Ag/PVA/Gr:Suprasorb, $p<0,001$
- 30. dan – Ag/PVA:Ag/PVA/Gr, $p<0,001$; Ag/PVA: Suprasorb, $p<0,001$; Ag/PVA/Gr: Suprasorb, $p<0,001$
- 60. dan – Ag/PVA:Ag/PVA/Gr, $p<0,001$; Ag/PVA: Suprasorb, $p<0,001$; Ag/PVA/Gr: Suprasorb, $p<0,001$

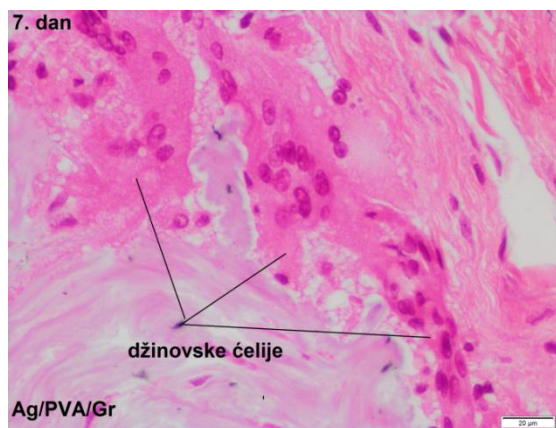
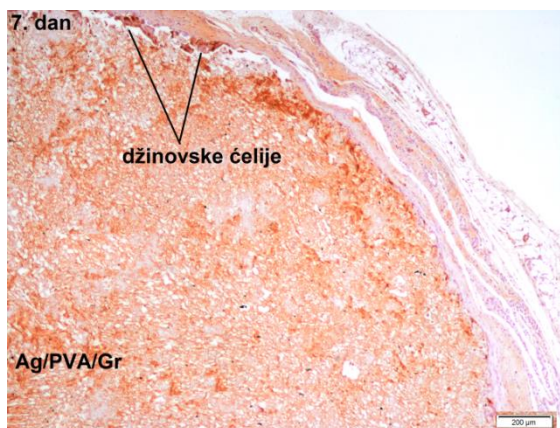
Grafikon 5.6. Uporedni prikaz broja džinovskih ćelija lokalizovanih oko supkutano implantiranih hidrogelova (Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suoprasorb) prikazan paralelno u svakom od perioda praćenja.



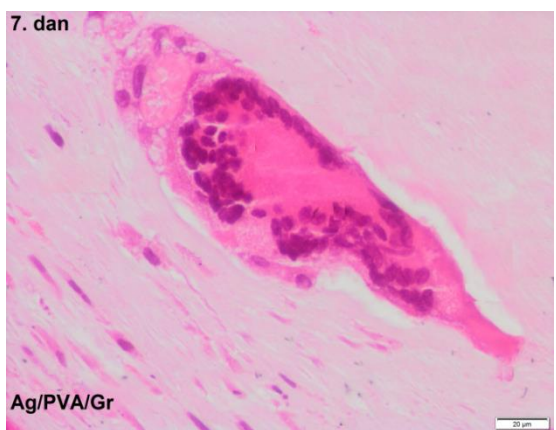
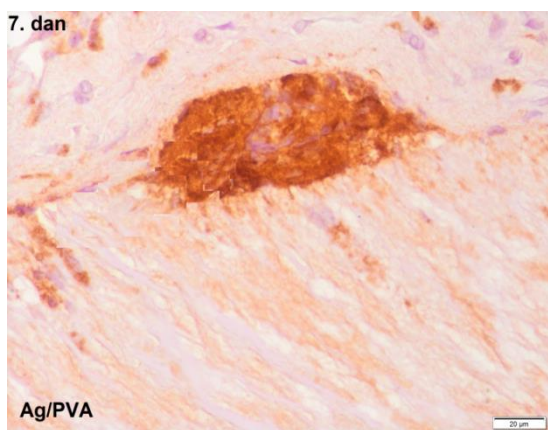
Grafikon 5.7. Uporedni prikaz broja džinovskih ćelija tipa lokalizovanih oko supkutano implantiranih hidrogelova (Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suoprasorb) u različitim periodima postoperativnog praćenja.



Slika 5.1. Džinovske ćelije tipa oko stranog tela lokalizovane po obodu implantata od Ag/PVA, 7. postoperativnog dana. H&E, bar:100µm, levo; IHH na CD68, bar:20µm, desno.

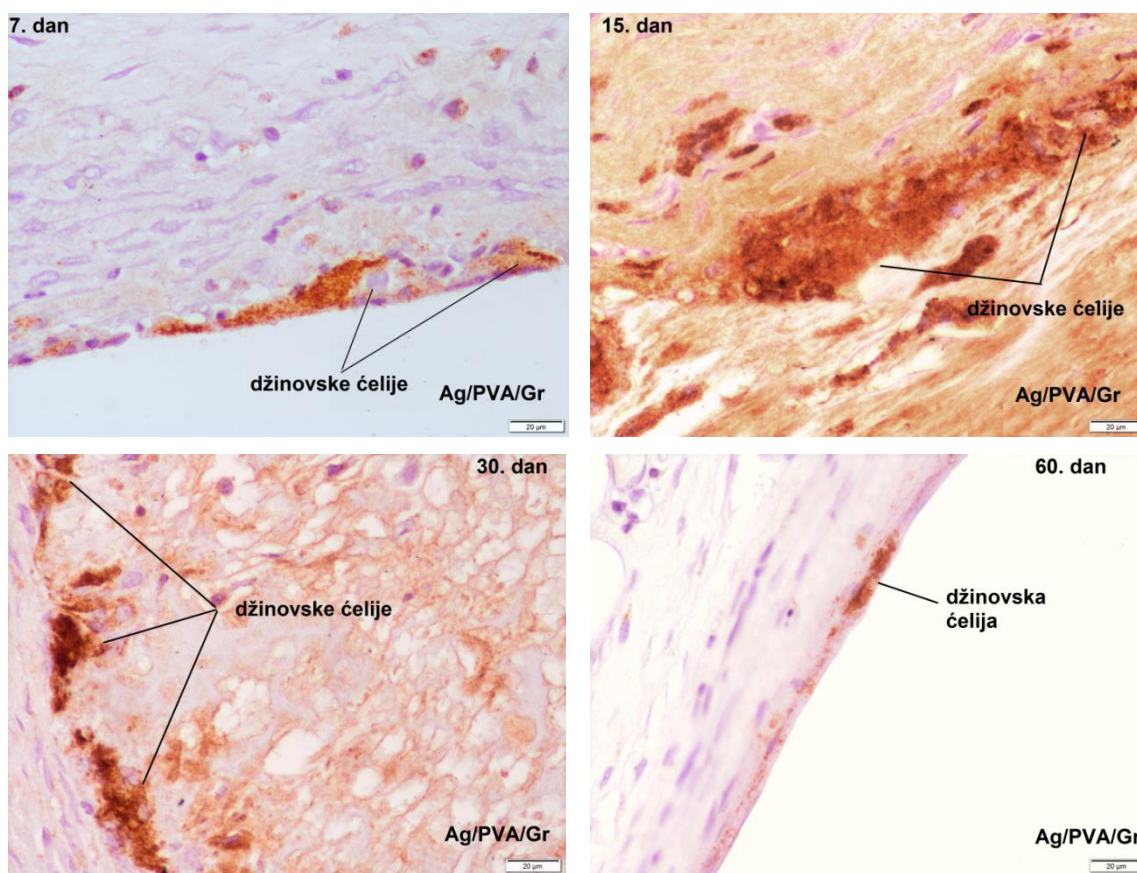


Slika 5.2. Džinovske ćelije tipa oko stranog tela lokalizovane po obodu implantata od Ag/PVA/Gr, 7. postoperativnog dana. IHH na CD68, bar:200µm, levo; H&E, bar:20µm, desno.

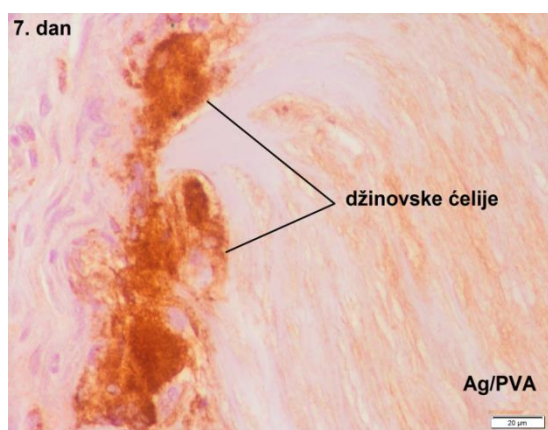


Slika 5.3. Džinovska ćelija tipa oko stranog tela lokalizovana oko implantata od Ag/PVA, 7. postoperativnog dana. IHH bojenje na CD68, bar:20µm.

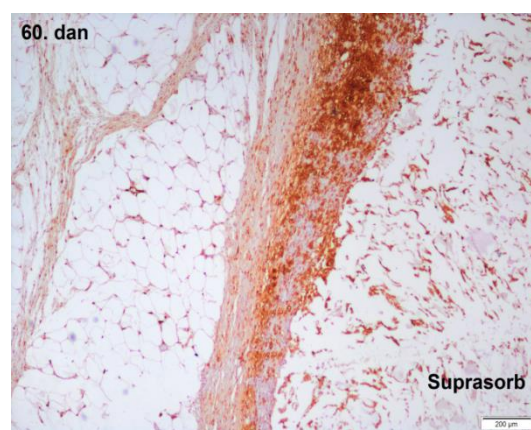
Slika 5.4. Džinovska ćelija tipa oko stranog tela lokalizovana oko implantata od Ag/PVA/Gr, 7. postoperativnog dana. H&E, bar:20µm.



Slika 5.5. Džinovske ćelije tipa oko stranog tela lokalizovane oko implantata od Ag/PVA/Gr, 7, 15, 30. i 60. postoperativnog dana. IHH bojenje na CD68, bar:100 μ m.



Slika 5.6. Džinovske ćelije tipa oko stranog tela, lokalizovane oko implantata od Ag/PVA, 7. postoperativnog dana. IHH bojenje na CD68, bar:20 μ m.



Slika 5.7. Kapsula i perikapsularno vezivno tkivo oko supkutano impantiranog Suprasorba 60. postoperativnog dana. IHH bojenje na CD68, bar:20 μ m. (Ne zapažaju se džinovske ćelije.)

Tabela 5.19. Statistička obrada rezultata Bonferonijevim *post hoc* testom broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela lokalizovanih oko supkutano implantiranih hidrogelova od Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorb, u različitim periodima posmatranja (7, 15, 30. i 60. postoperativnog dana).

Dependent Variable	(I) Grupa	(J) Grupa	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Ag/PVA	1	2	2.91550*	0.63333	<0.001	1.1998	4.6312
		3	3.36200*	0.63333	<0.001	1.6463	5.0777
		4	15.28550*	0.63333	<0.001	13.5698	17.0012
	2	1	-2.91550*	0.63333	<0.001	-4.6312	-1.1998
		3	0.44650	0.63333	1.000	-1.2692	2.1622
		4	12.37000*	0.63333	<0.001	10.6543	14.0857
	3	1	-3.36200*	0.63333	<0.001	-5.0777	-1.6463
		2	-0.44650	0.63333	1.000	-2.1622	1.2692
		4	11.92350*	0.63333	<0.001	10.2078	13.6392
	4	1	-15.28550*	0.63333	<0.001	-17.0012	-13.5698
		2	-12.37000*	0.63333	<0.001	-14.0857	-10.6543
		3	-11.92350*	0.63333	<0.001	-13.6392	-10.2078
Ag/PVA/Gr	1	2	-3.02100*	0.77492	0.001	-5.1203	-0.9217
		3	-4.97900*	0.77492	<0.001	-7.0783	-2.8797
		4	3.80900*	0.77492	<0.001	1.7097	5.9083
	2	1	3.02100*	0.77492	0.001	0.9217	5.1203
		3	-1.95800	0.77492	0.082	-4.0573	0.1413
		4	6.83000*	0.77492	<0.001	4.7307	8.9293
	3	1	4.97900*	0.77492	<0.001	2.8797	7.0783
		2	1.95800	0.77492	0.082	-0.1413	4.0573
		4	8.78800*	0.77492	<0.001	6.6887	10.8873
	4	1	-3.80900*	0.77492	<0.001	-5.9083	-1.7097
		2	-6.83000*	0.77492	<0.001	-8.9293	-4.7307
		3	-8.78800*	0.77492	<0.001	-10.8873	-6.6887
Suprasorb	1	2	1.83350*	0.18969	<0.001	1.3196	2.3474
		3	2.74950*	0.18969	<0.001	2.2356	3.2634
		4	3.43450*	0.18969	<0.001	2.9206	3.9484
	2	1	-1.83350*	0.18969	<0.001	-2.3474	-1.3196
		3	0.91600*	0.18969	<0.001	0.4021	1.4299
		4	1.60100*	0.18969	<0.001	1.0871	2.1149
	3	1	-2.74950*	0.18969	<0.001	-3.2634	-2.2356
		2	-0.91600*	0.18969	<0.001	-1.4299	-0.4021
		4	0.68500*	0.18969	0.003	0.1711	1.1989
	4	1	-3.43450*	0.18969	<0.001	-3.9484	-2.9206
		2	-1.60100*	0.18969	<0.001	-2.1149	-1.0871
		3	-0.68500*	0.18969	0.003	-1.1989	-0.1711

*. The mean difference is significant at the 0.05 level. 1-7. postoperativni dan; 2-15. postoperativni dan; 3-30. postoperativni dan; 4-60. postoperativni dan

Za razliku od toga, u slučaju implantacije Ag/PVA/Gr broj džinovskih ćelija se linearno povećavao sve do 30. postoperativnog dana, da bi 60. postoperativnog dana bio znatno smanjen (tabele 5.18 i 5.19, grafikoni 5.5 i 5.7). Međutim, broj džinovskih ćelija oko implantata Ag/PVA/Gr na kraju perioda praćenja, 60. postoperativnog dana, bio je značajno veći ($9,9360 \pm 1,9030$) u odnosu na isti broj kod implantacije Ag/PVA ($3,8835 \pm 0,7822$) i Suprasorba ($1,9030 \pm 0,7054$). U odnosu na Suprasorb, broj džinovskih ćelija na kraju perioda praćenja bio je veći i u slučaju implantiranog Ag/PVA (tabela 5.18 i grafikon 5.6).

5.1.5. Oblik i dimenzije hidrogelova Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba nakon implantacije

Rezultati praćenja promene oblika i veličine implantiranih hidrogelova pokazali su određeni stepen deformacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr u supkutanom vezivnom tkivu, ali su njihove dimenzije bile nepromenjene u svim terminima posmatranja.

Tabela 5.20. Dimenzije hidrogelova Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba nakon implantacije

Vrsta hidrogela	Dimenzije hidrogelova nakon implantacije (μm), ($X \pm SD$)							
	7. dan		15. dan		30. dan		60. dan	
	dužina	širina	dužina	širina	dužina	širina	dužina	širina
Ag/PVA	3997.21 ± 1.69	1990.3 3 ± 0.92	3869.81 ± 2.07	1896.79 ± 1.43	3712.54 ± 1.40	1869.17 ± 1.83	3649.41 ± 2.39	1907.46 ± 2.57
Ag/PVA/Gr	4074.81 ± 1.50	1966.04 ± 2.60	3976.99 ± 1.84	1942.92 ± 1.73	3956.61 ± 1.43	1922.18 ± 0.83	3784.84 ± 1.34	1929.81 ± 1.15
Suprasorb	3978.79 ± 0.74	2026.07 ± 1.59	3894.72 ± 1.52	1979.19 ± 1.76	3859.19 ± 1.75	1920.53 ± 1.59	3854.38 ± 2.23	1917.97 ± 2.04

5.2. IMUNOHISTOHEMIJSKA ISTRAŽIVANJA

Imunohistohemijским istraživanjima obuhvaćena je procena ekspresije glatkomišićnog aktina u krvnim sudovima, a na osnovu njihove vizualizacije određivana je brojnost krvnih sudova u koži i periimplantnoj zoni kod subkutane implantacije različitih hidrogelova.

Takođe, na osnovu imunohistohemijskog bojenja procenjavana je, na semikvantitativni način, ekspresija laminina i kolagena tipa 1 i 3 u strukturama kože i zoni oko implantata.

Imunohistohemijско određivanje ekspresije markera ćelijske proliferacije Ki67 služilo je za izračunavanje indeksa proliferacije epitelnih ćelija i ćelija vezivnog tkiva u koži, kao i indeksa proliferacije ćelija vezivnog tkiva oko zone implantacije.

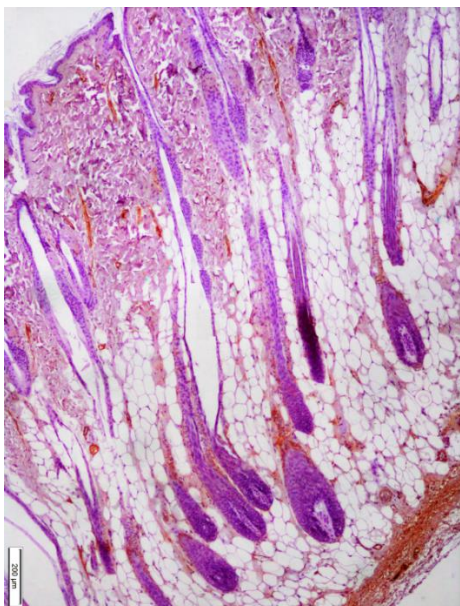
Na osnovu brojnosti ćelija u kojima je ekspimirana ssDNK određivan je apoptotski indeks u epitelu i vezivnom tkivu kože i zoni oko implantata od različitih hidrogelova.

Imunohistohemijским određivanjem ekspresije markera CD68 procenjivan je broj makrofaga u vezivnotkivnoj kapsuli i vezivnom tkivu oko implantata od različitih hidrogelova.

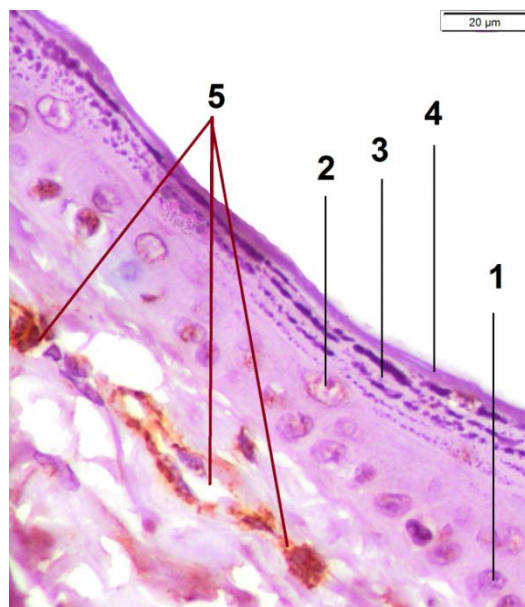
5.2.1. Ekspresija glatkomišićnog aktina u krvnim sudovima i stepen vaskularizacije vezivnotkivne kapsule i neposredne zone oko kapsule

Vaskularizacija u kontrolnoj intaktnoj koži tokom postoperativnog praćenja

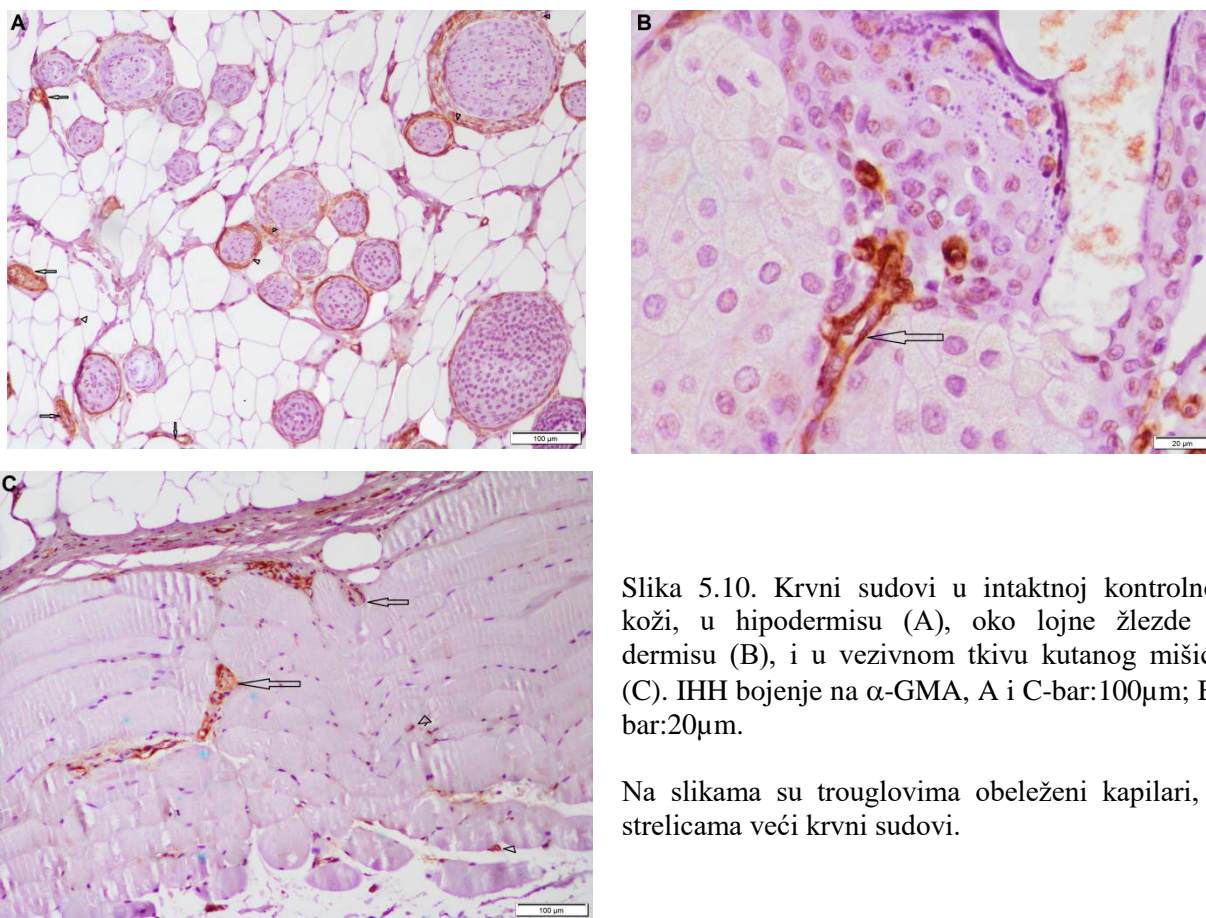
Na slici 5.8. vidi se tipična distribucija krvnih sudova u kontrolnom uzorku kože.



Slika 5.8. Vaskularizacija u kontrolnoj intaktnoj koži pacova. IHH bojenje na α -glatkomišićni aktin (α -GMA), bar:200 μ m.



Slika 5.9. Epidermis i retikularni dermis intaktnе kontrolne kože. 1. str. basale, 2. str. spinosum, 3. str. granulosum, 4. str. corneum, 5. krvni sud u papilarnom dermisu. IHH bojenje na α -GMA, bar:20 μ m.



Slika 5.10. Krvni sudovi u intaktnoj kontrolnoj koži, u hipodermisu (A), oko lojne žlezde u dermisu (B), i u vezivnom tkivu kutanog mišića (C). IHH bojenje na α -GMA, A i C-bar:100 μ m; B-bar:20 μ m.

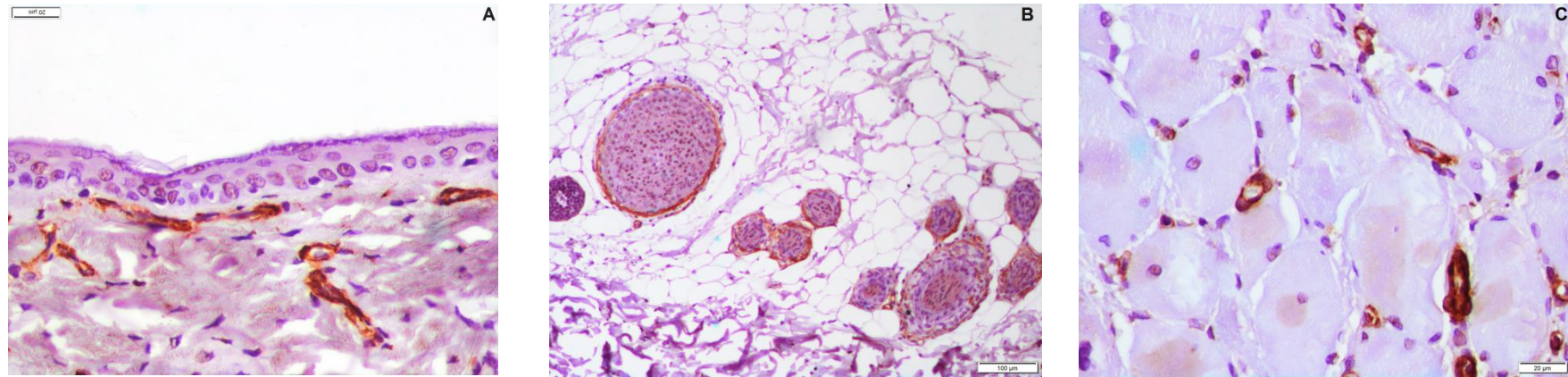
Na slikama su trouglovima obeleženi kapilari, a strelicama veći krvni sudovi.

Krvni sudovi se uočavaju u površinskom, papilarnom (sl. 5.9, 5.11A i 5.12A) i dubokom, retikularnom dermisu (sl. 5.8), u hipodermisu (sl. 5.10A, 5.11B i 5.12B) i vezivnom tkivu ispod hipodermisa, na granici sa kutanim mišićem, kao i u vezivnom tkivu kutanog mišića (sl. 5.10C, 5.11C i 5.12C). Bogata kapilarna mreža uočava se oko folikula dlake (sl. 5.8, 5.10A, 5.11B i 5.12B), kao i oko lojnih žlezda (sl. 5.10B).

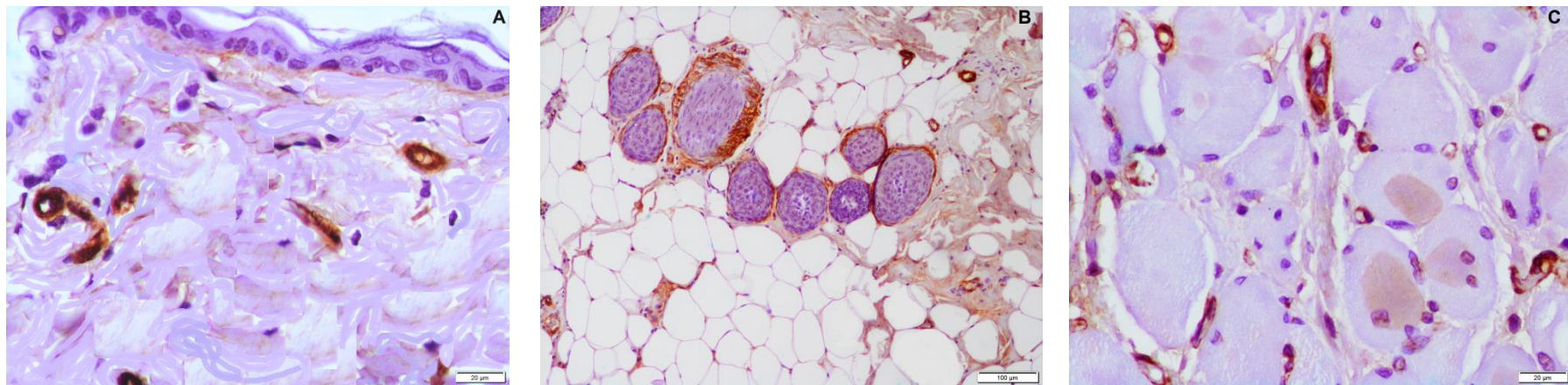
Vaskularizacija kože u zoni incizione rane

Vaskularizacija kože pacova u zoni incizione rane tokom različitih perioda posmatranja od momenta načinjene incizije, prikazana je na slikama 5.13–5.17.

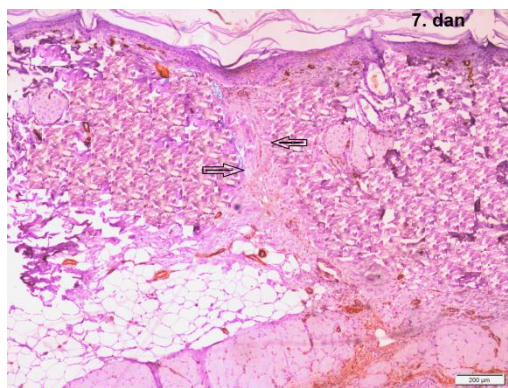
Vaskularizacija papilarnog i retikularnog dermisa bila je znatno viša počev od 15. postoperativnog dana i zadržala se u istom stepenu sve do 60. postoperativnog dana, u odnosu na 7. postoperativni dan (sl. 5.13 – 5.17).



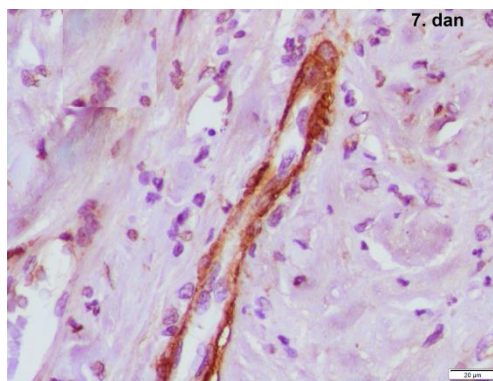
Slika 5.11. Vaskularizacija dermisa (A), hipodermisa (B) i kutanog mišića (C), u uzorku intaktne kontrolne kože udaljene od zone implantacije, 15. post-impantacionog dana. IHH bojenje na α -GMA, A i C-bar:20 μ m; B-bar:100 μ m.



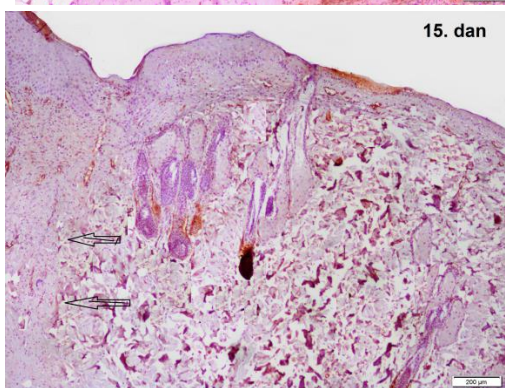
Slika 5.12. Vaskularizacija dermisa (A), hipodermisa (B) i kutanog mišića (C), u uzorku intaktne kontrolne kože udaljene od zone implantacije, 30. post-impantacionog dana. IHH bojenje na α -GMA, A i C-bar:20 μ m; B-bar:100 μ m.



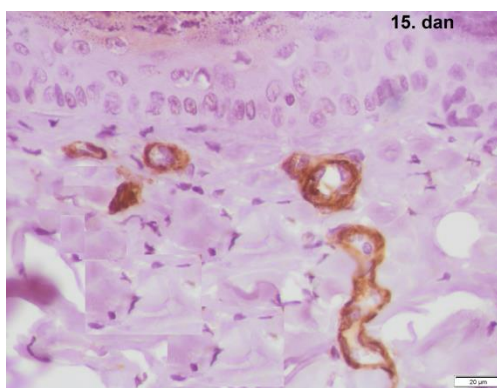
Sl. 5.13A



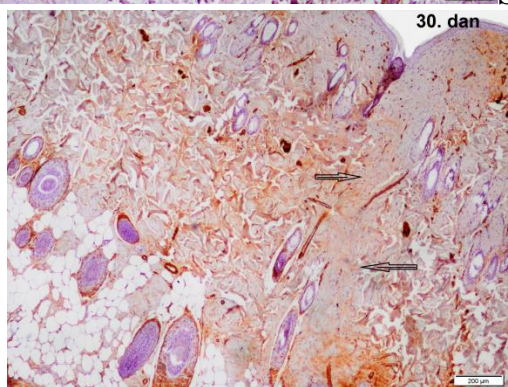
Sl. 5.13B



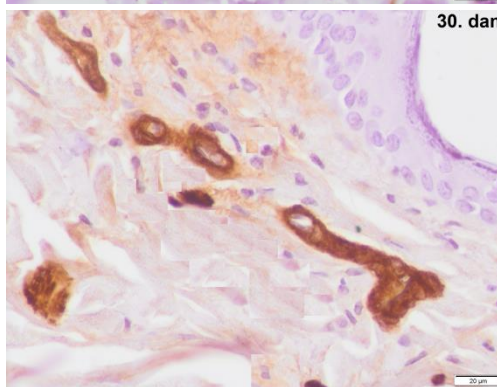
Sl. 5.14A



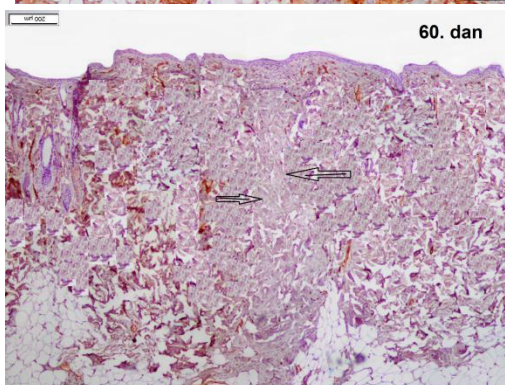
Sl. 5.14B



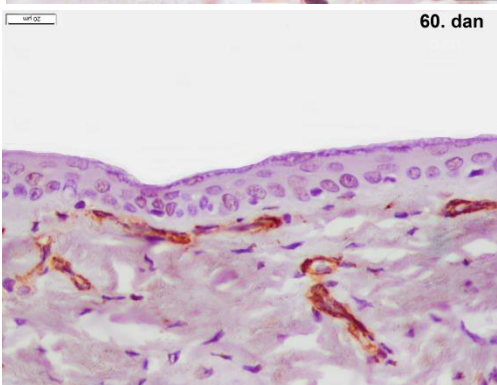
Sl. 5.15A



Sl. 5.15B

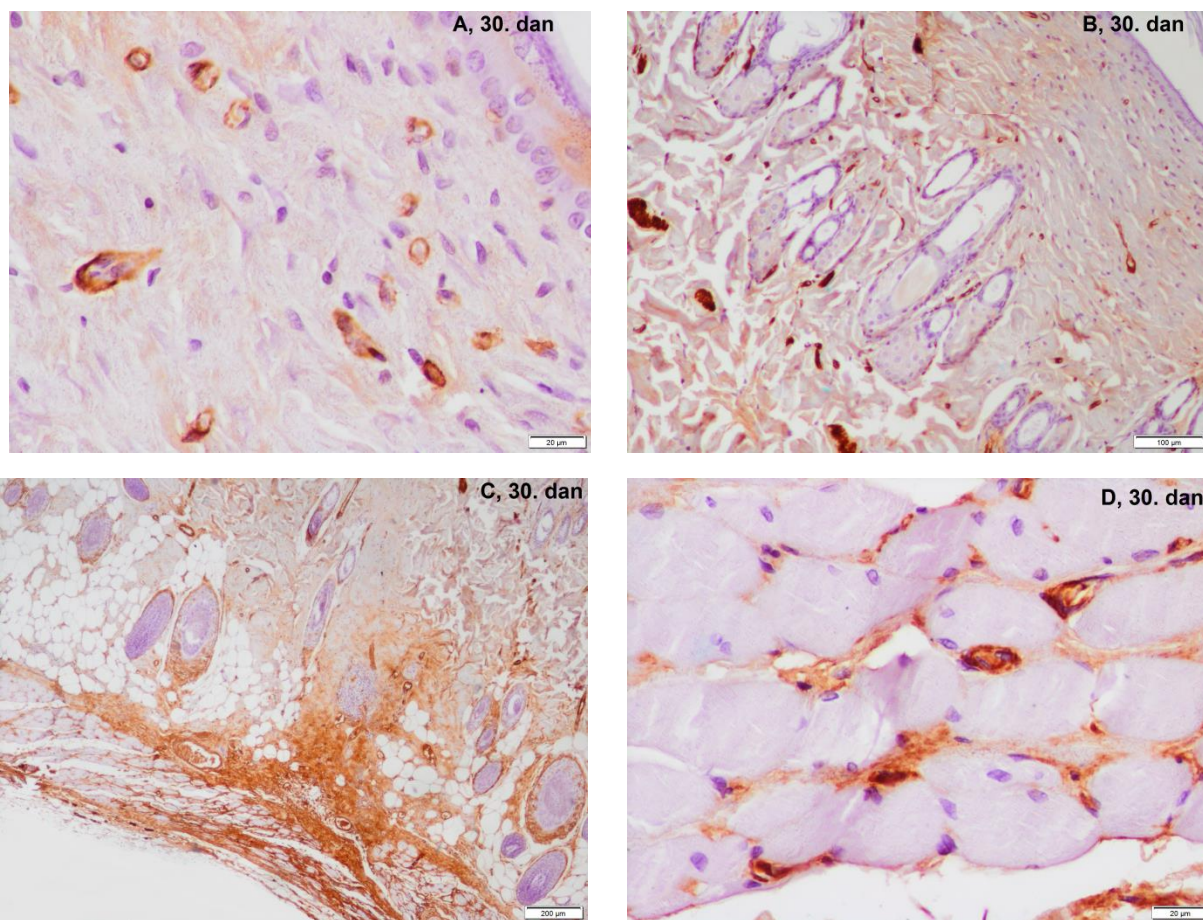


Sl. 5.16A



Sl. 5.16B

Slike 5.13 – 5.16. Zona incizije (levo, strelice) i detalj sa krvnim sudovima u dermisu (desno) u zoni incisione rane, 7. dana (sl. 5.13A i B), 15. dana (sl. 5.14A i B), 30. dana (sl. 5.15A i B) i 60. dana (sl. 5.16A i B) nakon operacije. IHH bojenje na α -GMA, A-bar:200 μ m; B-bar:20 μ m.



Slika 5.17. Vaskularizacija površinskog (A) i dubokog dermisa (B), hipodermisa sa masnim tkivom (C) i kutanog mišića (D) u zoni incizionne rane, 30. postoperativnog dana. IHH bojenje na α -GMA, A i D-bar:20 μ m; B-bar:100 μ m; C-bar:200 μ m.

Vaskularizacije vezivnotkivne kapsule i vezivnog tkiva oko kapsule kod supkutane aplikacije različitih hidrogelova

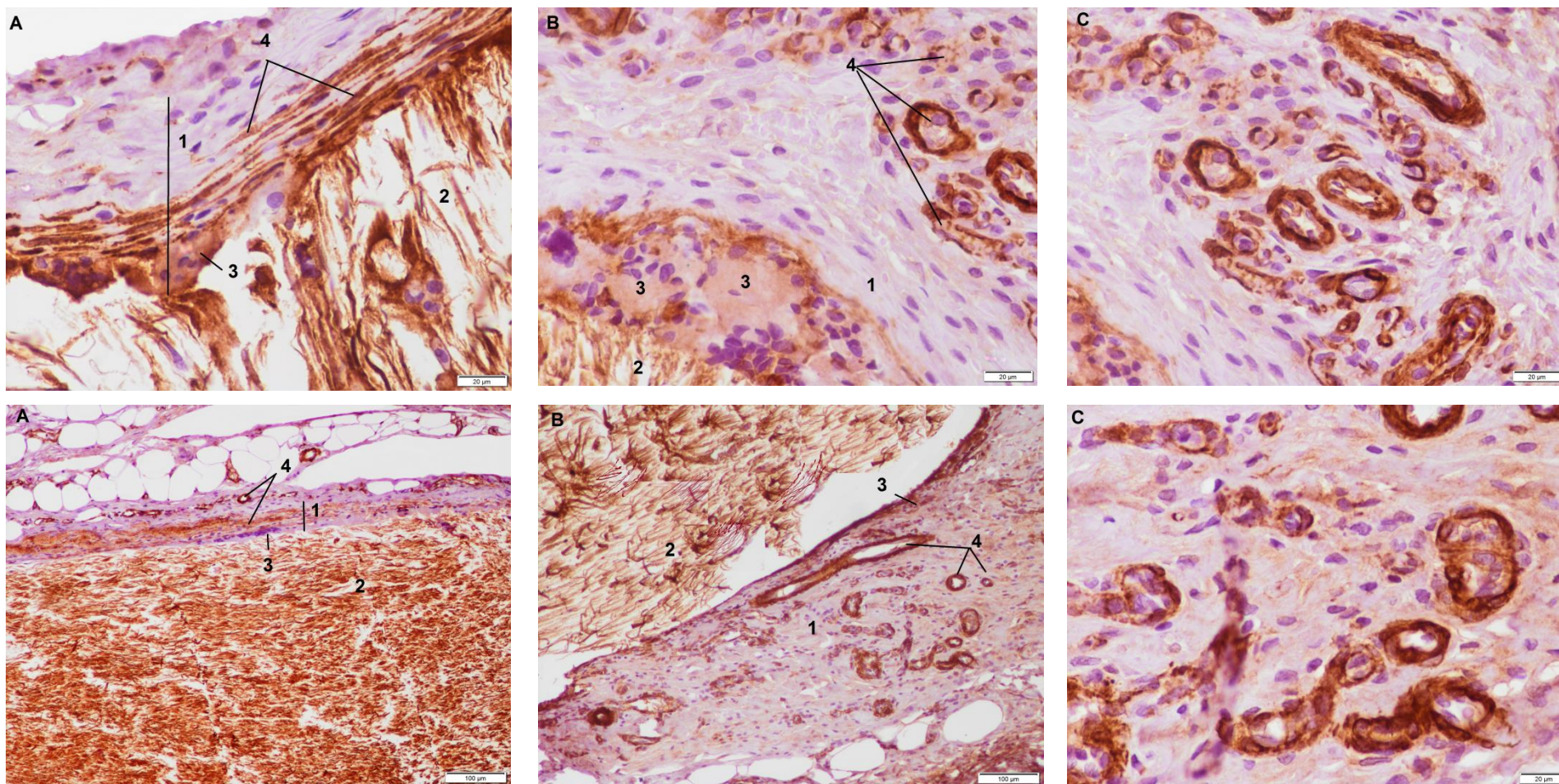
Rezultati semikvantitativne procene stepena vaskularizacije vezivnotkivne kapsule i vezivnog tkiva oko kapsule kod supkutane aplikacije različitih hidrogelova prikazani su u tabeli 5.21.

U slučaju implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr stepen vaskularizacije vezivnotkivne kapsule i vezivnog tkiva koje je neposredno okružuje, bio je visok u svim periodima posmatranja (7, 15, 30. i 60. postoperativnog dana). Krvni sudovi zauzimali su od 30% do 50% površine vezivnotkivne kapsule i od 10% do 30% površine vezivnog tkiva lokalizovanog neposredno oko kapsule, u svim periodima posmatranja (tabela 5.21; sl.5.18-5.21, 5.23, 5.24, 5.26 i 5.27).

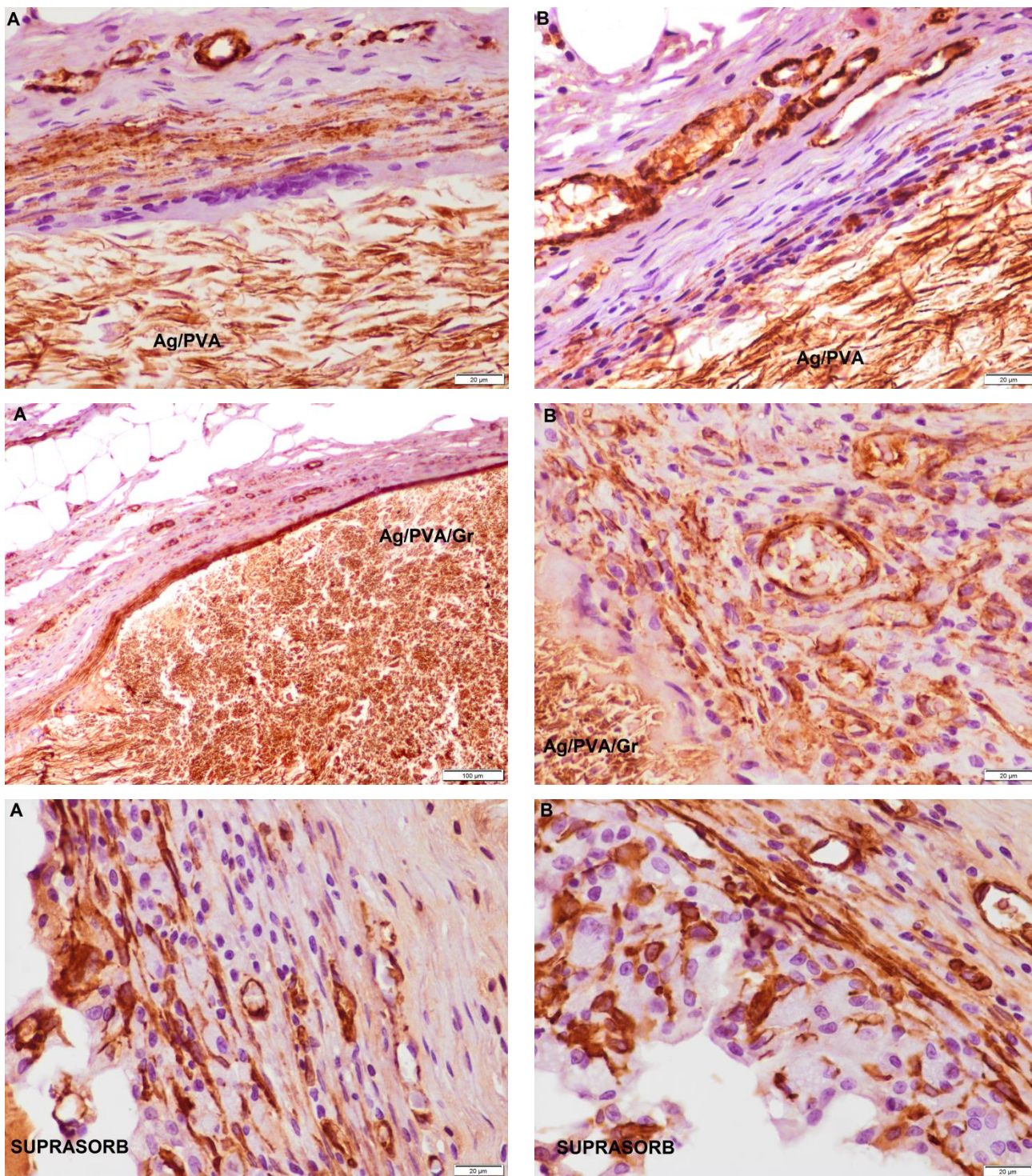
Tabela 5.21. Vaskularizacija vezivnotkivne kapsule i vezivnog tkiva oko kapsule kod supkutane aplikacije različitih hidrogelova.

Vreme posmatranja	Semikvantitativna procena stepena vaskularizacije		
	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb
7. dan			
kapsula	+++	+++	+++
zona oko kapsule	++	++	++
15. dan			
kapsula	+++	+++	++
zona oko kapsule	++	++	++
30. dan			
kapsula	+++	+++	++
zona oko kapsule	++	++	++
60. dan			
kapsula	+++	+++	++
zona oko kapsule	++	++	++
+, krvni sudovi zauzimaju do 10% površine posmatrane strukture; ++, krvni sudovi zauzimaju od 11% do 30% površine posmatrane strukture; +++, krvni sudovi zauzimaju od 31% do 50% posmatrane strukture; +++++, krvni sudovi zauzimaju preko 50% površine posmatrane strukture			

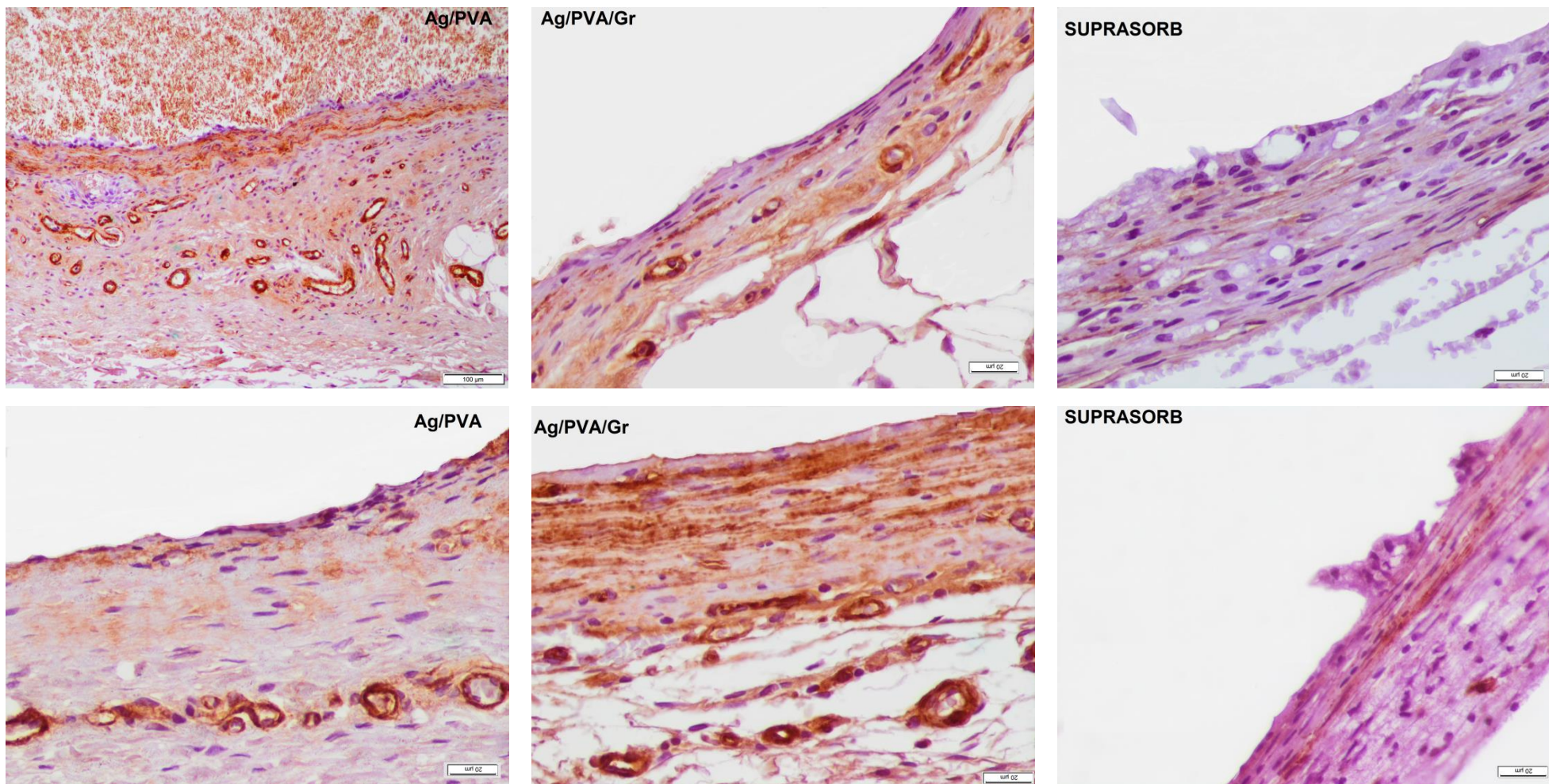
U slučaju implantacije Suprasorba stepen vaskularizacije vezivnotkivne kapsule bio je visok 7. dana nakon implantacije, a zatim nešto niži u vezivnotkivnoj kapsuli u daljem toku eksperimenta (15, 30. i 60. dan). Krvni sudovi su 7. dana posmatranja zauzimali od 30% do 50% površine vezivnotkivne kapsule, ali u 15, 30. i 60. postoperativnom danu kapsula je bila manje vaskularizovana u odnosu na 7. dan i krvni sudovi zazimali su od 10% do 30% površine kapsule (tabela 5.21 i sl. 5.22, 5.25 i 5.28). Što se tiče stepena vaskularizacije vezivnotkivne zone koja neposredno okružuje kapsulu, on je bio sličan kao i u slučaju implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/ Gr u svim periodima posmatranja: od 10% do 30% površine posmatrane zone zauzimali su krvni sudovi (tabela 5.21).



Slike 5.18 i 5.19. Vaskularizacija vezivnotkivne kapsule i zone oko kapsule kod supkutane implantacije Ag/PVA (A, B i C, gornji red, sl. 5.18) i Ag/PVA/Gr (A, B i C, donji red, sl. 5.19), 7. dana nakon implantacije. 1, kapsula; 2, implantat, 3, džinovska ćelija, 4, krvni sudovi. IHH bojenje na α -GMA, gornji red A, B i C-bar:20 μ m; donji red A i B-bar:100 μ m; C-bar:20 μ m.



Slike 5.20, 5.21. i 5.22. Vaskularizacija vezivnotkivne kapsule i zone oko kapsule kod supkutane implantacije Ag/PVA (A i B, gornji red, sl. 5.20), Ag/PVA/Gr (A i B, srednji red, sl. 5.21) i Suprasorb (A i B, donji red, sl. 5.22), 15. dana nakon implantacije. Na slikama je obeleženo mesto sa implantatima od različitih hidrogelova. IHH bojenje na α -GMA, gornji red A i B-bar:20 μ m; srednji red A-bar:100 μ m; B-bar:20 μ m; donji red A i B-bar:20 μ m.



Slike 5.23. – 5.28. Vaskularizacija vezivnotkivne kapsule i zone oko kapsule kod supkutane implantacije hidrogelova od Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba, 30. dana (gornji red, sl. 5.23, 5.24 i 5.25), 60. dana nakon implantacije (donji red, sl. 5.26, 5.27. i 5.28). IHH bojenje na α -GMA, gornji red A-bar:100 μ m; B i C-bar:20 μ m; donji red A, B i C-bar:20 μ m.

5.2.2. Ekspresija laminina u koži kod supkutane aplikacije različitih hidrogelova

Ekspresija laminina, jednog od najvažnijih proteina ECM, prikazana je u tabelama 5.22 do 5.25 i ilustrovana slikama 5.29 do 5.43.

Ekspresija laminina u kontrolnoj intaktnoj koži tokom postoperativnog praćenja

Rezultati istraživanja su pokazali da se laminin (Lam) eksprimira u epitelnim ćelijama epidermisa normalne intaktne kože i njegovim derivatima – epitelnim ćelijama lojnih žlezda i folikula dlake. U dermisu kože zapaža se ekspresija Lam u *m. arrector pili* i retkim fibroblastima, kao i u mišićnom sloju i adventiciji krvnih sudova. U hipodermisu ekspresija je zapažena u bazalnoj lamini i vezivnoj stromi oko adipocita, a u kutanom mišiću u samim mišićnim ćelijama. Ekspresija Lam u krvnim sudovima hipodermisa i kutanog mišića je slična kao ekspresija u krvnim sudovima dermisa. Pored toga Lam se eksprimirao u endo-, peri- i epineurijumu nervnih fascikulusa zapaženih u različitim delovima kože (sl. 5.29).

Na osnovu izračunatog skora ekspresije Lam, dobijenog sabiranjem jačine ekspresije u svakom od spomenutih strukturnih elemenata kože, zapaža se da je taj skor za oko 30% do 50% veći u normalnoj intaktnoj koži u 7. (16/30) i 15. postoperativnom danu (15/30), u odnosu na skor ekspresije u 30. (9,5/30) i 60. (10/30) postoperativnom danu (tabele 5.22-5.25).

Ekspresija laminina u koži i periimplantnoj zoni nakon implantacije različitih hidrogelova

Što se tiče ekspresije Lam u koži u zoni implantata, rezultati su pokazali, na osnovu ukupnog skora, vrlo sličnu ekspresiju kao i u intaktnoj koži udaljenoj od zone implantacije, u slučaju supkutane implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr u prva dva termina praćenja, 7. (16,5/30 za Ag/PVA i Ag/PVA/Gr) i 15. dana (18/30 za Ag/PVA i 15/30 za Ag/PVA/Gr). Nakon toga stepen ekspresije je opao i bio je identičan u 30. i 60. postoperativnom danu za oba hidrogela (14/30), ali je ta ekspresija bila veća u odnosu na uzorke intaktne kontrolne kože udaljene od mesta implantacije za oko 40% (tabele 5.22-5.25; sl. 5.29-5.32 i 5.38).

Međutim, obrazac ekspresije Lam u različitim terminima postoperativnog praćenja u slučaju supkutano implantiranog Suprasorba unekoliko se razlikovao od obrasca ekspresije do kojeg je dovela supkutana aplikacija Ag/PVA i Ag/PVA/Gr (tabele 5.22-5.25; sl. 5.33-5.35).

Tabela 5.22. Semikvantitativna procena ekspresije laminina (Lam) u koži 7. dana nakon supkutane implantacije različitih hidrogelova.

Vrsta hidrogela/ posmatrana struktura	Ekspresija Lam u koži 7. dana nakon implantacije hidrogelova				
	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	Zona lažne operacije	Intaktna koža
1. Epidermis	+++	+++	+++	++	+++
2. Dermis					
lojne žlezde	++	++	+	+	++
folikuli dlake	++	++	++	++	++
<i>m. arrector pili</i>	+ / ++	+ do ++	++	+	++
krvni sudovi	++	++	++	+	++
vezivno tkivo	0	0	0	0	0
fibroblasti	+	+	+	++	0
3. Hipodermis	+	+	+	+	+
krvni sudovi	++	++	+	+	+
4. Kutani mišić	++	++	+	+	++
Ukupni skor eksp. Lam (1+2+3+4), maks. 30	16,5/30	16,5/30	14,0/30	12,0/30	16,0/30
5. Unutrašnja miš. fascija	++	++	++	+	+
6. Kapsula oko implantata	++	++	++	∅	∅
7. Perikapsularno supkut. vez.	++	++	++	∅	∅
Ukupni skor eksp. Lam (6+7), maks. 6	4/6	4/6	4/6	∅	∅

Tabela 5.23. Semikvantitativna procena ekspresije laminina (Lam) u koži 15. dana nakon supkutane implantacije različitih hidrogelova.

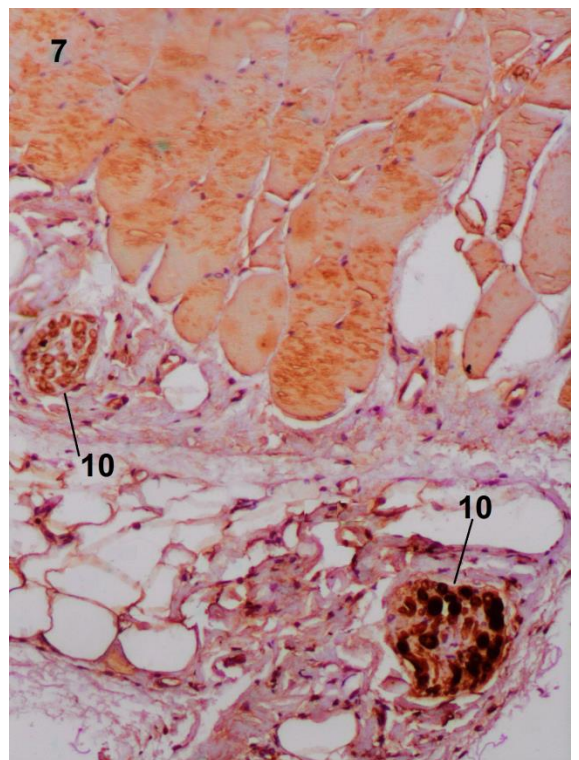
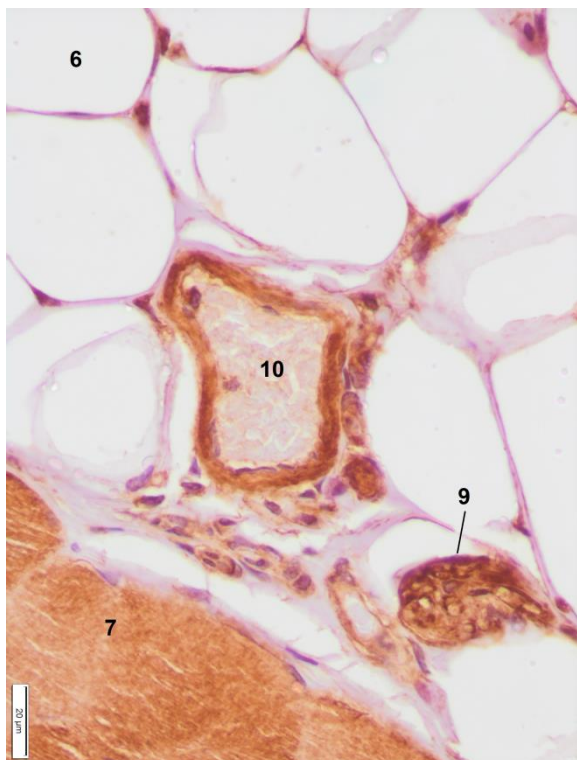
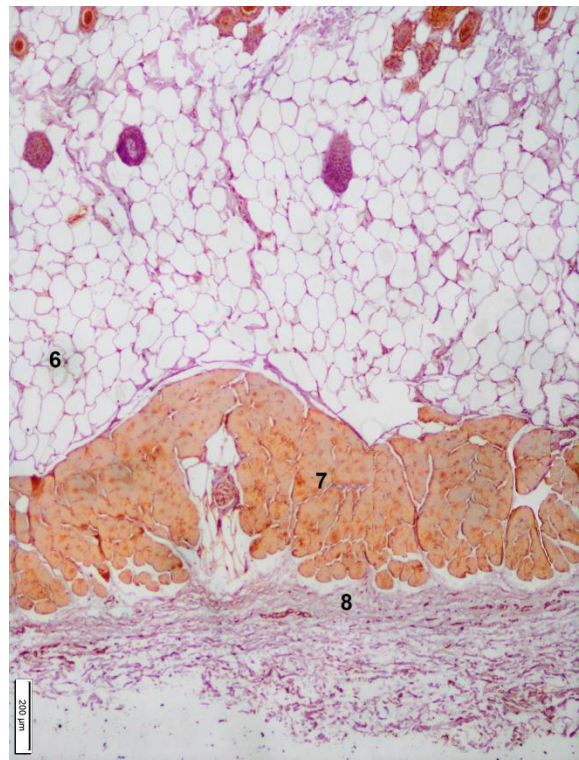
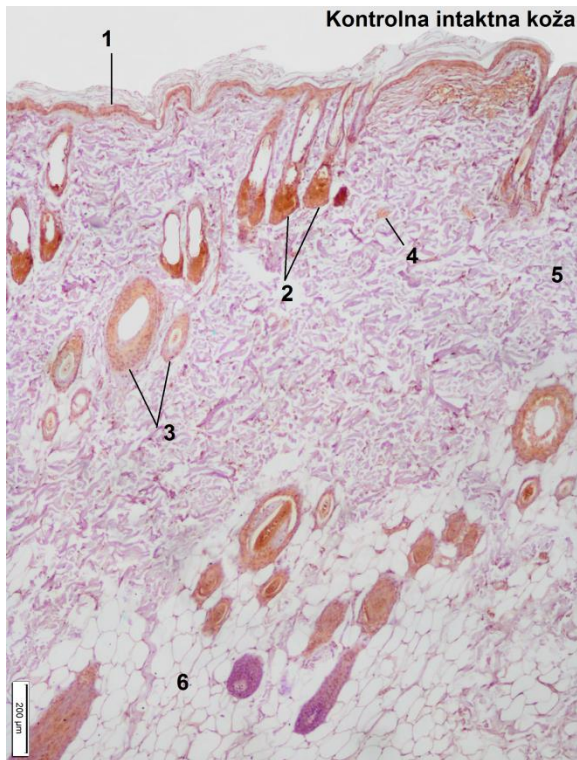
Vrsta hidrogela/ posmatrana struktura	Ekspresija laminina u koži 15. dana nakon implantacije hidrogelova				
	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	Zona lažne operacije	Intaktna koža
1. Epidermis	+++	+++	+++	+	+++
2. Dermis					
lojne žlezde	++	++	++ / +++	+ / ++	++
folikuli dlake	++ / +++	++	++ / +++	+	++
<i>m. arrector pili</i>	++ / +++	++	++	+	++
krvni sudovi	++	++	+ / ++	+	+
vezivno tkivo	0	0	0	0	0
fibroblasti	+	+	1	+	+
3. Hipodermis	+	+	+	+	+
krvni sudovi	++	++	++	+	+
4. Kutani mišić	++	+	++	+	++
Ukupni skor ekspres. Lam (1+2+3+4), maks. 30	18,0/30	15/30	19,0/30	9,5/30	15,0/30
5. Unutrašnja miš. fascija	+	+	+	+	+
6. Kapsula oko implantata	++	++	+++	∅	∅
7. Perikapsularno supkut. vez.	++	++	+++	∅	∅
Ukupni skor eksp. Lam (6+7), maks. 6	4/6	4/6	6/6	∅	∅

Tabela 5.24. Semikvantitativna procena ekspresije laminina u koži 30. dana nakon supkutane implantacije različitih hidrogelova.

Vrsta hidrogela/ posmatrana struktura	Ekspresija laminina u koži 30. dana nakon implantacije hidrogelova				
	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	Zona lažne operacije	Intaktna koža
1. Epidermis	++/+++	+++	+++	+	+
2. Dermis					
lojne žlezde	++	++	+++	++	+ / ++
folikuli dlake	+ / ++	+	+++	+	+
m. arrector pili	+	++	+++	+	+
krvni sudovi	+	+	++	++	+
vezivno tkivo	0	0	0	0	0
fibroblasti	+	+	+	+	+
3. Hipodermis	+	+	+	+	+
krvni sudovi	+	+	++	++	+
4. Kutani mišić	++	++	++ / +++	++	+
Ukupni skor ekspres. Lam (1+2+3+4), maks. 30	14,0	14,0	23,0	13,0	9,5
5. Unutrašnja miš. fascija	+	+	++	+	+
6. Kapsula oko implantata	+	+	+++	∅	∅
7. Perikapsularno supkut. vez.	+	+	+++	∅	∅
Ukupni skor ekspr. Lam (6+7), maks. 6	2/6	2/6	6/6	∅	∅

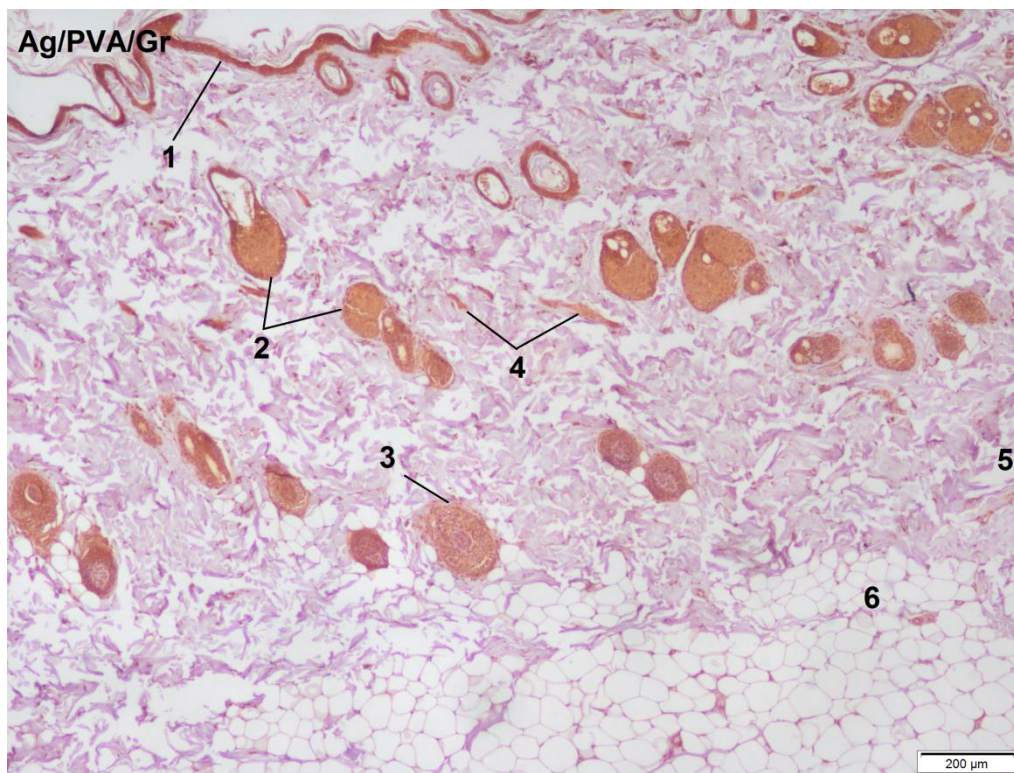
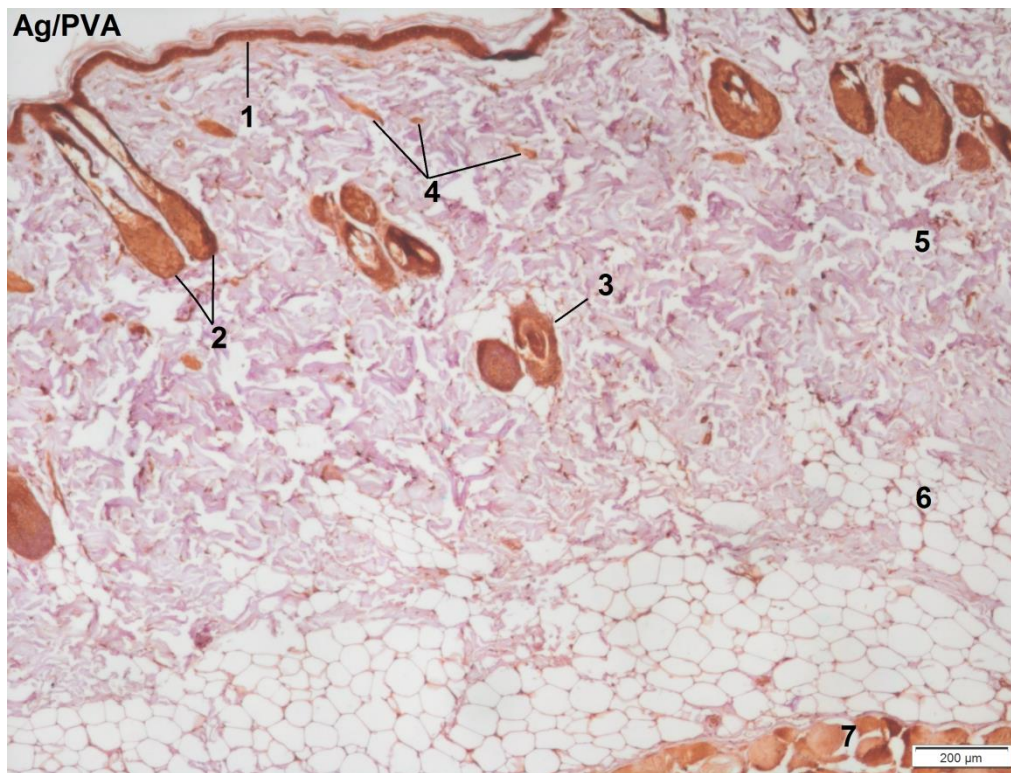
Tabela 5.25. Semikvantitativna procena ekspresije laminina (Lam) u koži 60. dana nakon supkutane implantacije različitih hidrogelova.

Vrsta hidrogela/ posmatrana struktura	Ekspresija laminina u koži 60. dana nakon implantacije hidrogelova				
	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	Zona lažne operacije	Intaktna koža
1. Epidermis	++/+++	++/+++	+++	+	+
2. Dermis					
lojne žlezde	++	++	++ / +++	++	++
folikuli dlake	+ / ++	+ / ++	++ / +++	+ / ++	+
m. arrector pili	+	+	++	+	+
krvni sudovi	+	+	++	+	+
vezivno tkivo	0	0	0	0	0
fibroblasti	+	+	1	+	+
3. Hipodermis	+	+	+	+	+
krvni sudovi	+	+	++	+	+
4. Kutani mišić	++	++	++	+	+
Ukupni skor ekspres. Lam (1+2+3+4), maks. 30	14,0	14,0	20,0/30	10,5	10,0
5. Unutrašnja mišićna fascija	+	+	+	+	+
6. Kapsula oko implantata	+	+	++	∅	∅
7. Perikapsularno supkut. vez.	+	+	++	∅	∅
Ukupni skor ekspr. Lam (6+7), maks. 6	2/6	2/6	4/6	∅	∅



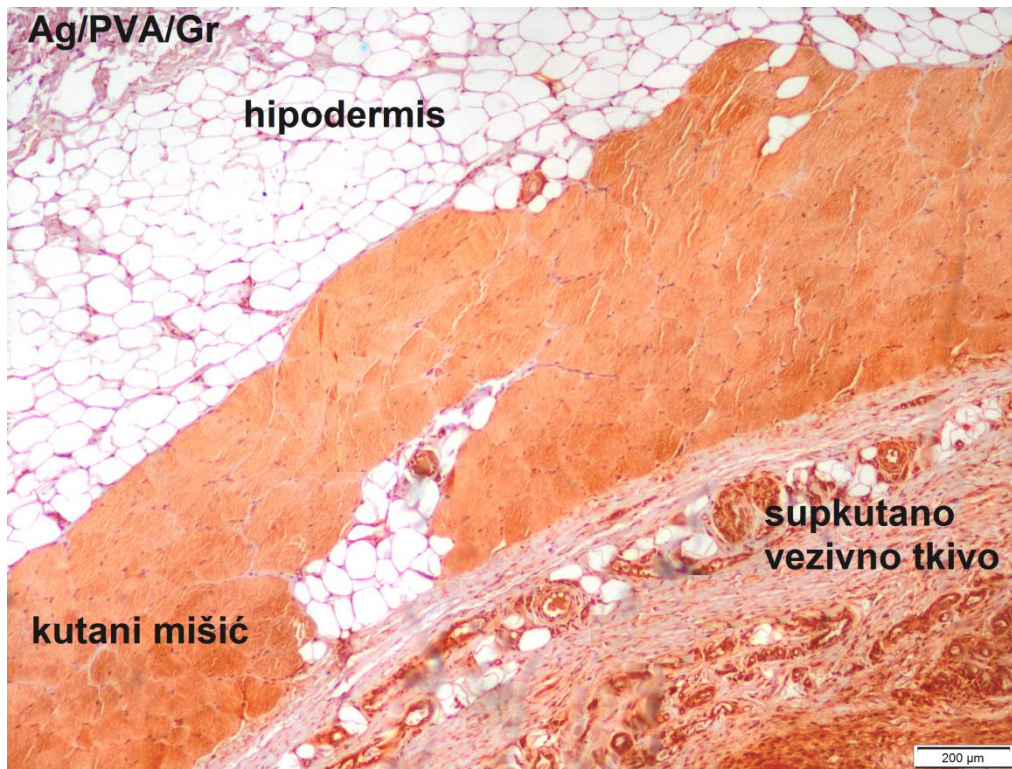
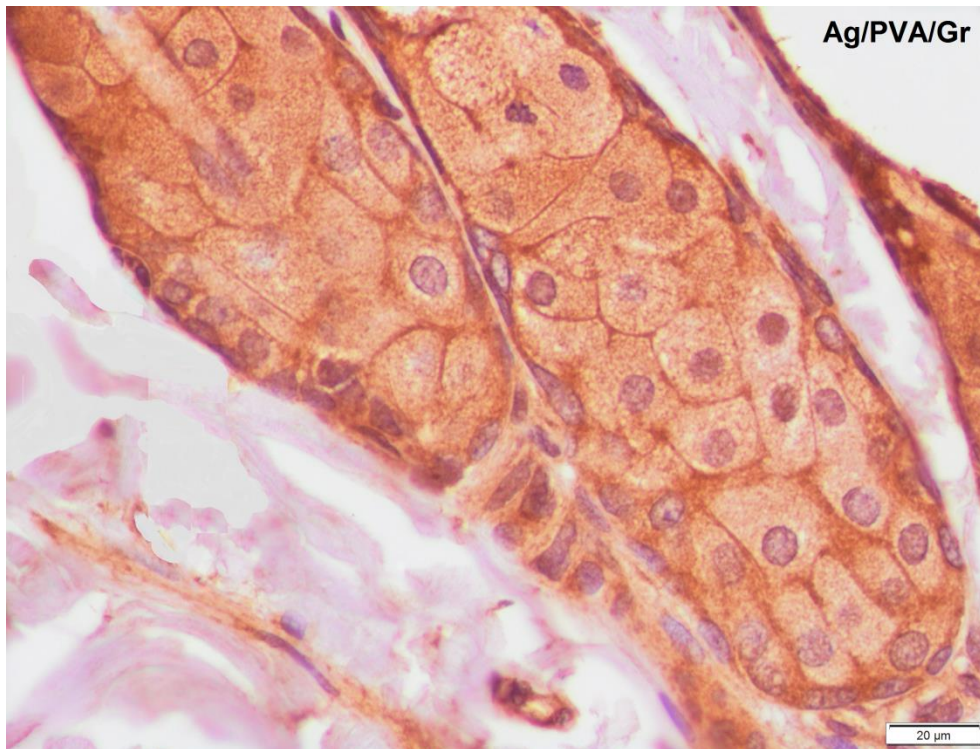
Slika 5.29. Ekspresija laminina u uzorku kontrolne intaktne kože pacova, 7. dana nakon implantacije hidrogelova, IHH bojenje na Lam, gornji red-bar:20 μ m; donji red-bar:20 μ m.

1. epidermis, 2. lojne žlezde, 3. folikuli dlake, 4. *m. arrector pili*, 5. dermis, 6. masno tkivo hipodermisa, 7. kutani mišić, 8. unutrašnja mišićna fascija, 9. krvni sud, 10. nerv.



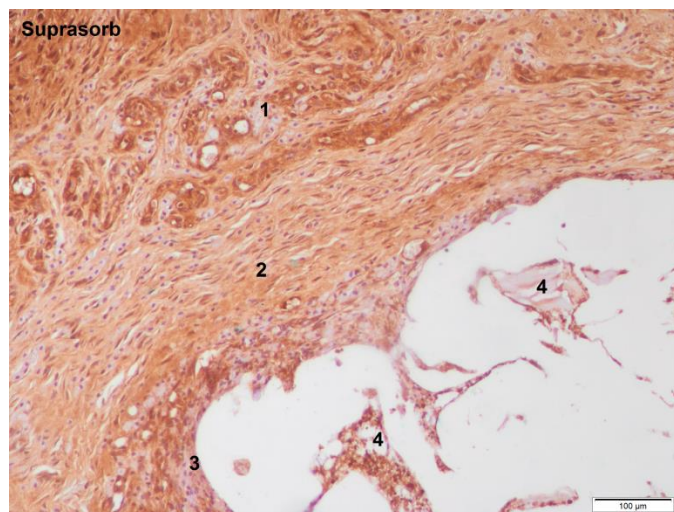
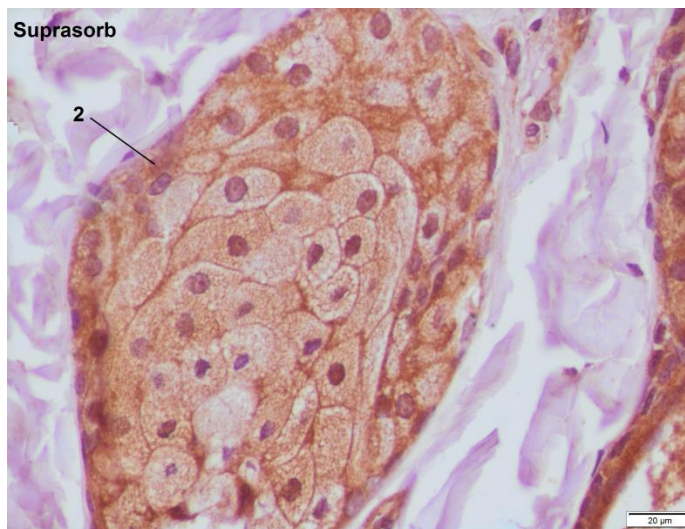
Slike 5.30. i 5.31. Ekspresija laminina u koži pacova 7. dana nakon implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, IHH bojenje na Lam, bar:200μm.

1. epidermis, 2. lojne žlezde, 3. folikul dlake, 4. *m. arrector pili*, 5. dermis, 6. masno tkivo hipodermisa.



Slika 5.32. Ekspresija laminina u koži 7. dana nakon implantacije Ag/PVA/Gr u lojnoj žlezdi (slika gore), kao i u hipodermisu, kutanom mišiću i supkutano vezivnom tkivu (slika dole), IHH bojenje na Lam, gornja slika-bar:20μm; donja slika-bar:200μm.

☆ krvni sudovi; glavice strelica su na nervima.

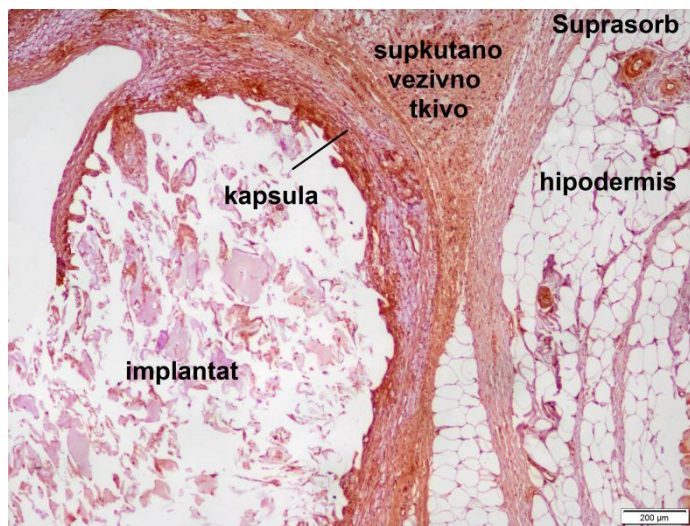
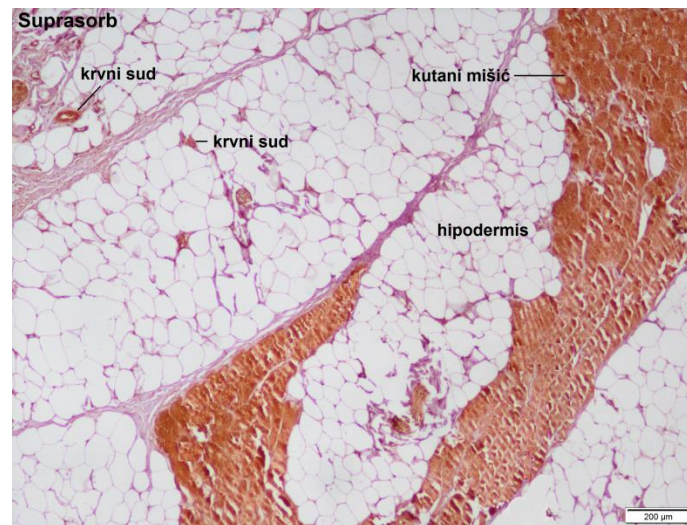
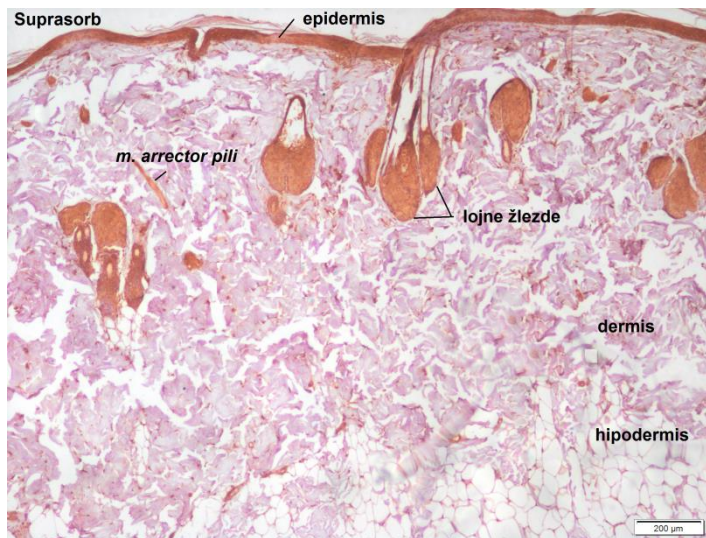


Slika 5.33A i B (gore, levo i desno). Ekspresija laminina u koži (A) i lojnoj žlezdi kože (B) kod supkutane aplikacije Suprasorba, 7. postoperativnog dana, IHH bojenje na Lam, A-bar:100 μ m; B-bar:20 μ m.

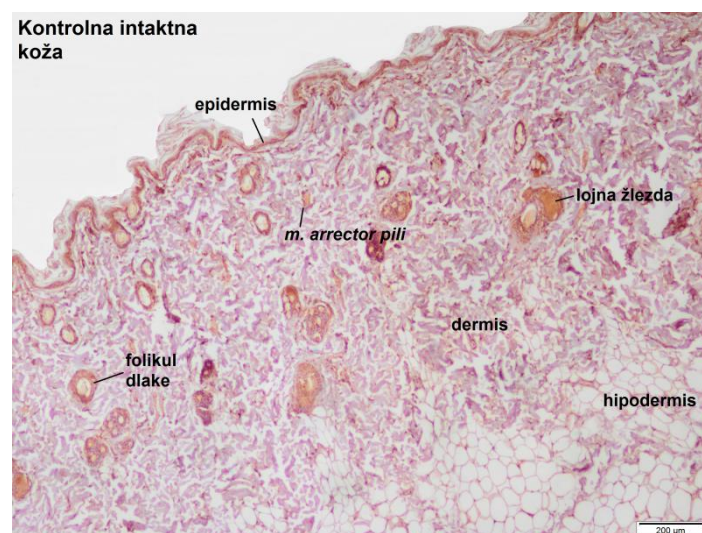
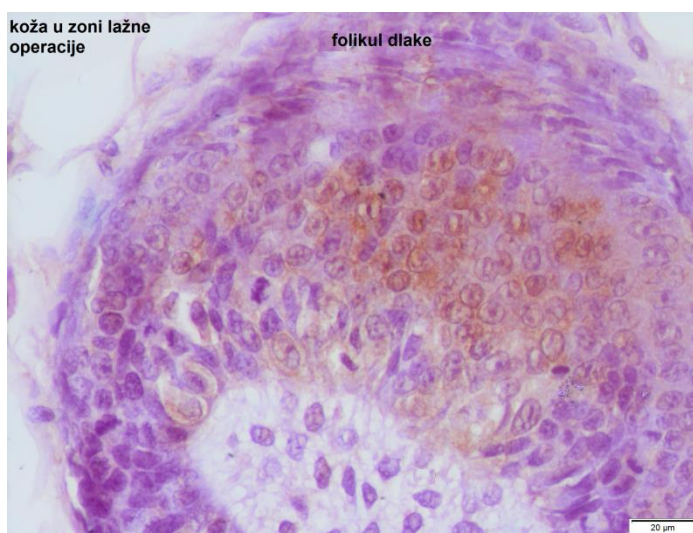
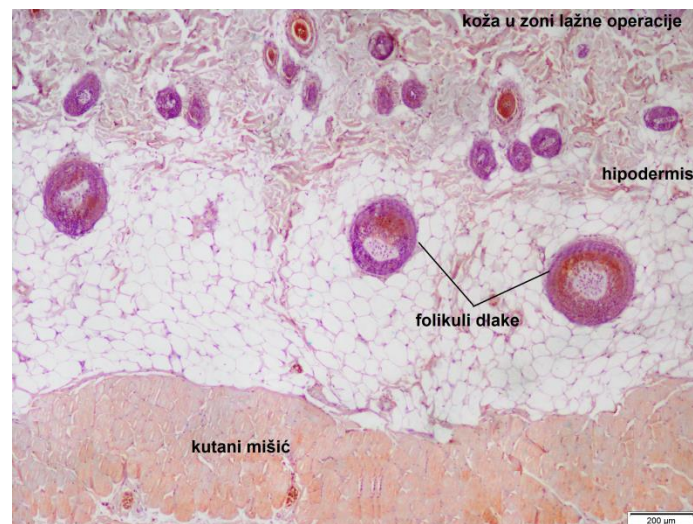
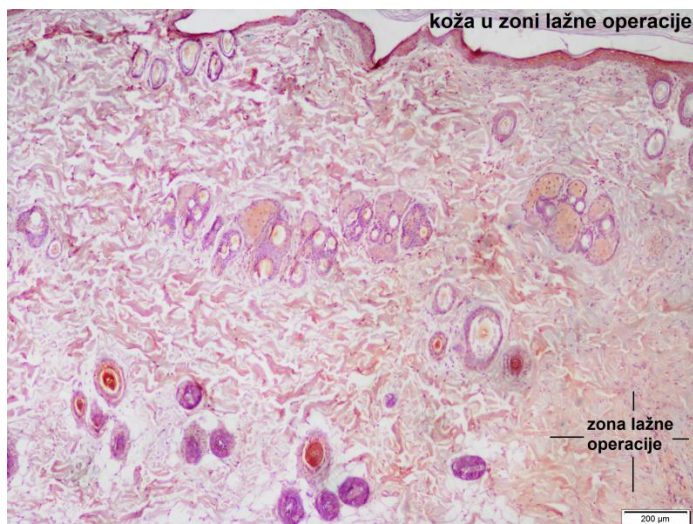
1. epidermis, 2. lojna žlezda, 3. folikul dlake.

Slika 5.34 (dole). Ekspresija laminina u supkutanom tkivu kod implantacije Suprasorba, 7. postoperativnog dana, IHH bojenje na Lam, bar:100 μ m.

1. supkutano vezivno tkivo sa brojnim krvnim sudovima; 2. periimplantno vezivno tkivo, 3. vezivnotkivna kapsula, 4. fragmenti Suprasorba.



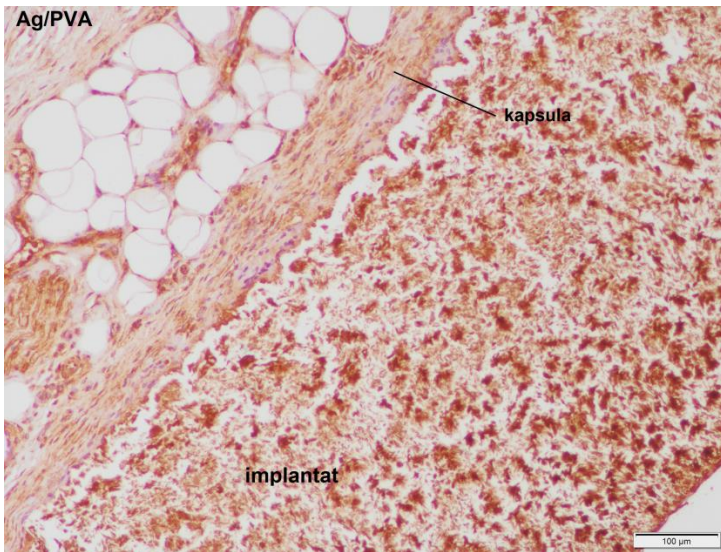
Slika 5.35. Ekspresija laminina u koži (gore levo), kutanom mišiću (gore desno), supkutano vezivnom tkivu i periimplantnoj zoni (dole), 30. dana nakon supkutane implantacije Suprasorba, IHH bojenje na Lam, bar:200μm.



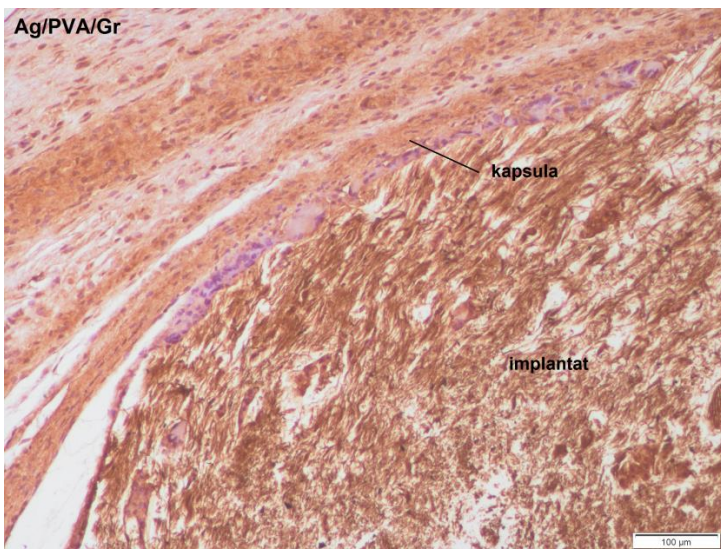
Slike 5.36. i 5.37. Ekspresija laminina u koži (gore levo), kutanom mišiću (gore desno) i folikulu dlake (dole levo) u zoni lažne operacije, 15. postoperativnog dana, IHH bojenje na Lam, gornji red-bar:200µm; donji red-bar:20µm.

Slika 5.38. Ekspresija laminina u kontrolnoj intaktnoj koži (dole desno), 15. postoperativnog dana, IHH bojenje na Lam, bar:200µm.

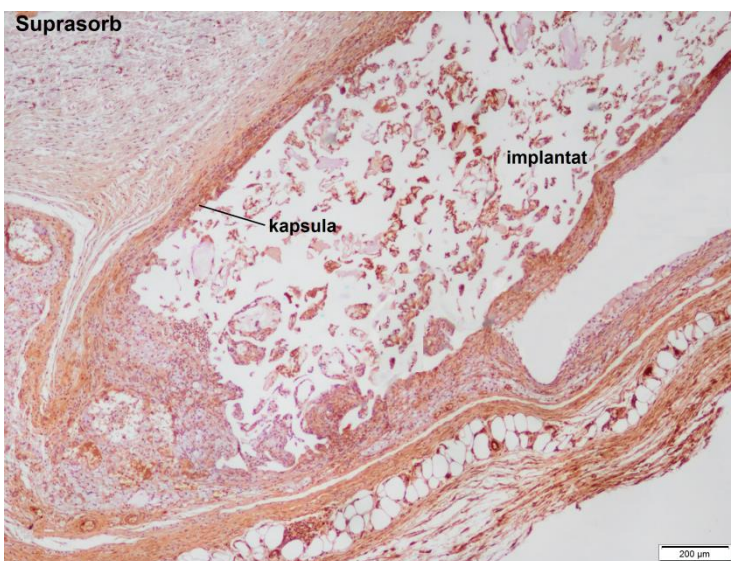
Skor ekspresije Lam u 15. danu (19/30), 30. danu (23/30) i 60. postoperativnom danu (20/30) bio je daleko veći u odnosu na 7. postoperativni dan (14/30), kao i u odnosu na ekspresiju u uzorcima intaktne kože udaljene od mesta implantacije (15/30, za 15. dan; 9,5/30 za 30. dan i 10/30 za 60. dan praćenja). Ta ekspresija bila je veća u odnosu na normalnu kožu za 25% 15. postoperativnog dana, za 100% 60. postoperativnog dana i čak za 130% 30. dana praćenja (sl. 5.33-5.35 i 5.38).



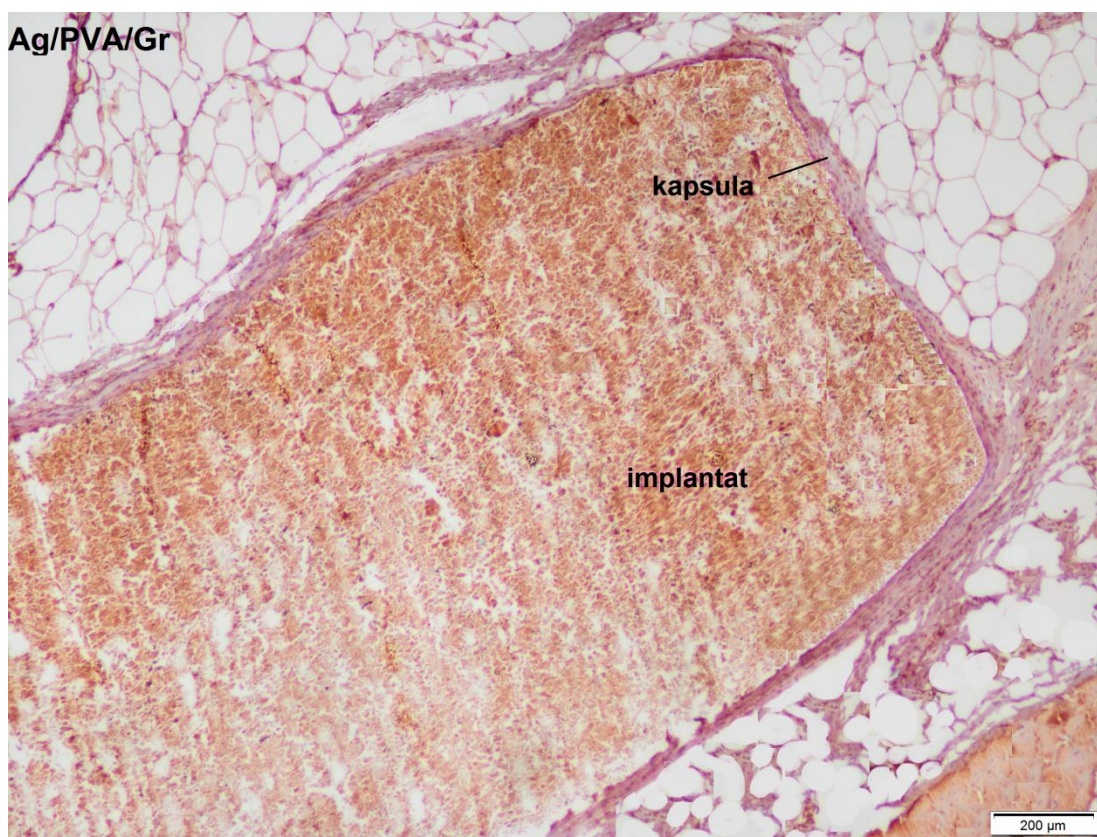
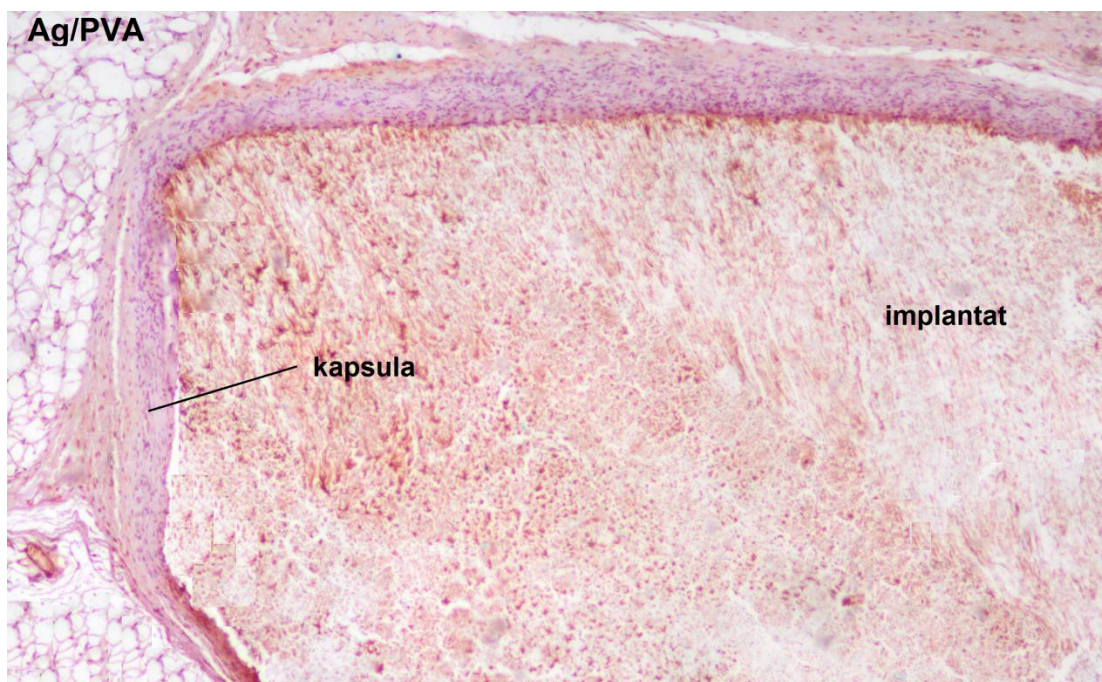
Slika 5.39. Ekspresija Lam u vezivnotkivnoj kapsuli i periimplantnom vezivnom tkivu, 15 dana nakon implantacije Ag/ PVA, IHH bojenje na Lam, bar:100μm.



Slika 5.40. Ekspresija laminina u vezivnotkivnoj kapsuli i periimplantnom vezivnom tkivu, 15 dana nakon implantacije Ag/PVA/Gr, IHH bojenje na Lam, bar:100μm.



Slika 5.41. Ekspresija laminina u vezivnotkivnoj kapsuli i periimplantnom vezivnom tkivu, 15 dana nakon implantacije Suprasorba, IHH bojenje na Lam, bar:200μm.



Slika 5.42 (gore). Implantat od Ag/PVA sa kapsulom i periimplantnim vezivom 30. dana nakon implantacije, IHH bojenje na Lam, bar:200μm.

Slika 5.43 (dole). Implantat od Ag/PVA/Gr sa kapsulom i periimplantnoim vezivom 30. dana nakon implantacije, IHH bojenje na Lam, bar:200μm.

Ekspresija laminina u koži u zoni lažne operacije

Ekspresija Lam u koži u zoni lažne operacije, 7. (skor 12/30) i 15. (skor 9,5/30) postoperativnog dana, bila je niža u odnosu na ekspresiju u uzorcima intaktne kože udaljene od mesta lažne operacije (16/30 za 7. postoperativni dan i 15/30 za 15. postoperativni dan), kao i u odnosu na supkutano aplikovane Ag/PVA (16,5/30 za 7. i 18/30 za 15. dan praćenja), Ag/PVA/Gr (16,5/30 za 7. i 15/30 za 15. dan praćenja) i Suprasorb (14/30 za 7. i 19/30 za 15. dan praćenja) (tabele 5.22 i 5.25). U 30. postoperativnom danu nivo ekspresije Lam u koži u ovoj eksperimentalnoj grupi bio je sličan ekspresiji kod subkutane aplikacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, što je bilo za oko 40% više u odnosu na ekspresiju u uzorcima intaktne kože (13/30 : 9,5/30). Konačno, u 60. postoperativnom danu nivo ekspresije laminina u koži u zoni incizije bio je veoma sličan ekspresiji u uzorcima intaktne kože, što je bilo znatno niže od ekspresije ovog proteina u koži životinja sa supkutanom aplikacijom hidrogelova, naročito Suprasorba (tabele 5.22-5.25; sl. 5.33-5.38).

Ekspresija laminina u vezivnotkivnoj kapsuli i supkutanom periimplantnom vezivnom tkivu kod aplikacije različitih hidrogelova

Što se tiče ekspresije Lam u vezivnotkivnoj kapsuli koja okružuje implantate, kao i u supkutanom periimplantnom vezivnom tkivu izvan kapsule, ona je bila umerena u obe zone (skor 4/6) kod implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr u 7. i 15. danu nakon operacije, tj. slaba (skor 2/6) u 30. i 60. postoperativnom danu (sl. 5.39, 5.40, 5.42 i 5.43). Za razliku od toga ekspresija Lam u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu u slučaju supkutane aplikacije Suoprasorba bila je znatno veća u odnosu na istu kod aplikacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr u 15, 30. i 60. postoperativnom danu. Laminin se najjače ekspresirao u navedenim histološkim zonama 15. i 30. dana nakon aplikacije Suprasorba (skor 6/6) (tabele 5.22-5-25; sl. 5.41).

5.2.3. Ekspresija kolagena tipa I i kolagena tipa III u koži kod supkutane aplikacije različitih hidrogelova

Ekspresija kolagena tipa I

Ekspresija kolagena tipa I (Kol I) u vezivnom tkivu kože i kutanog mišića kod aplikacije različitih hidrogelova tokom postoperativnog perioda praćenja prikazana je u tabeli 5.26 i na slikama 5.44 do 5.47. Kolagen tipa I se u intaktnoj koži i u koži kod aplikacije sva tri hidrogela eksprimira u vezivnom tkivu dermisa, hipodermisa i kutanog mišića, sa najvećom ekspresijom u dermisu, i takav obrazac ekspresije ostaje nepromenjen tokom čitavog perioda praćenja. U zoni lažne operacije 15. postoperativnog dana pojačana je ekspresija Kol I u vezivnom tkivu dermisa (naročito u papilarnom dermisu) i hipodermisa, u odnosu na ostale termine posmatranja, kao i u odnosu na ekspresiju u slučaju aplikacije hidrogelova.

Ekspresija Kol I u vezivnotkivnoj kapsuli oko implantata i perikapsularnom supkutanom vezivnom tkivu kod aplikacije različitih hidrogelova tokom postoperativnog perioda praćenja prikazana je u tabeli 5.27 i na slikama 5.48 do 5.50. Kapsula oko implantata Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, i perikapsularno supkutano vezivno tkivo koje se neposredno graniči sa kapsulom, imali su umerenu ekspresiju Kol I u 15, 30. i 60. danu nakon implantacije, bez razlika u odnosu na vrstu implantiranog materijala. Međutim ekspresija Kol I u navedenim terminima, u istim zonama, bila je slabija prilikom aplikacije Suprasorba.

Ekspresija kolagena tipa III

Ekspresija kolagena tipa III (Kol III) u vezivnom tkivu kože i kutanog mišića kod aplikacije različitih hidrogelova tokom postoperativnog perioda praćenja prikazana je u tabeli 5.28 i na slikama 5.51 do 5.54. Obrazac ekspresije Kol III bio je identičan obrascu ekspresije kolagena tipa I u svim postoperativnim terminima nakon aplikacije različitih hidrogelova, kao i tokom zarastanja rane u zoni lažne operacije (incizionna rana).

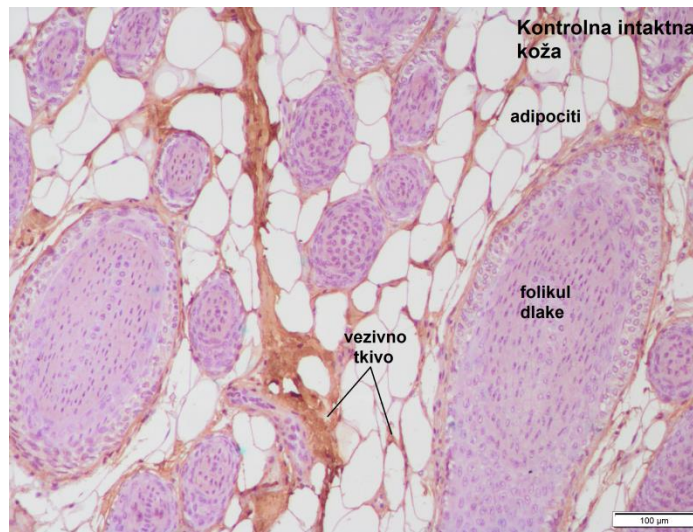
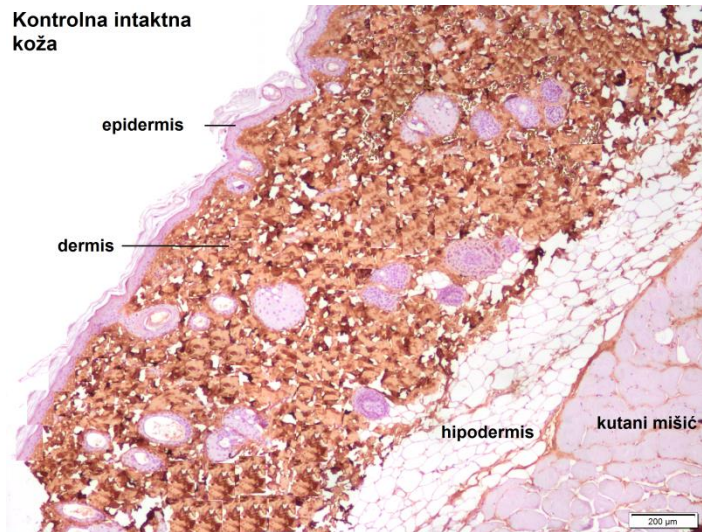
Ekspresija Kol III u kapsuli oko implantata i perikapsularnom vezivnom tkivu kod aplikacije različitih hidrogelova tokom postoperativnog perioda praćenja prikazana je u tabeli 5.29 i na slikama 5.55 do 5.62. Prilikom aplikacije sva tri hidrogela u kapsuli je registrovana blaga ekspresija kolagena tipa III, a u perikapsularnom vezivnom tkivu umerena ekspresija u 15, 30. i 60. postoperativnom danu. Ekspresija je bila pojačana u kapsuli kod aplikacije Ag/PVA/Gr 7. postoperativnog dana u odnosu na ekspresiju kod aplikacije Ag/PVA i Suprasorba.

Tabela 5.26. Ekspresija kolagena tipa I u vezivnom tkivu kože i kutanog mišića kod aplikacije različitih hidrogelova tokom postoperativnog perioda praćenja

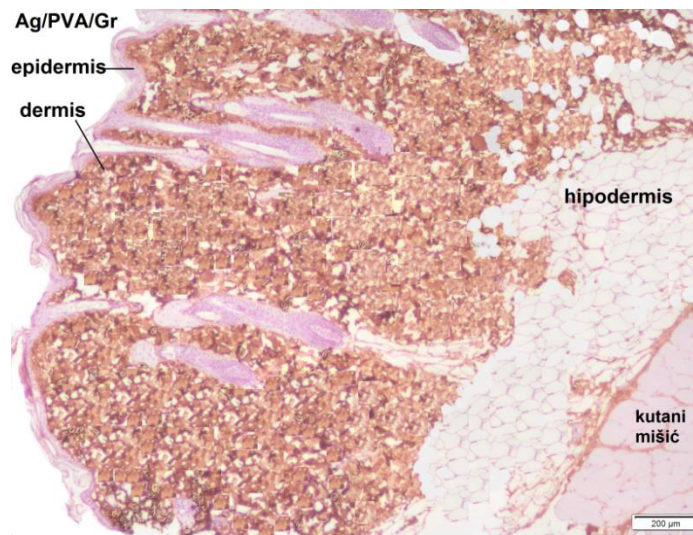
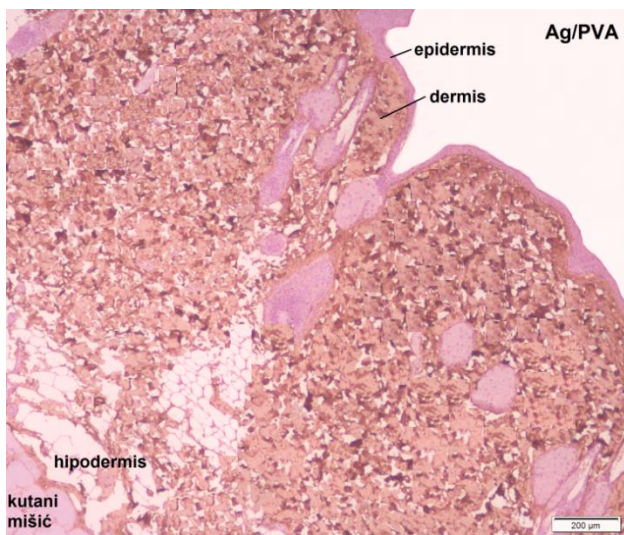
Vrsta hidrogela/ posmatrana struktura	Ekspresija kolagena tipa I u koži nakon implantacije različitih hidrogelova				
	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	Zona lažne operacije	Intaktna koža
7. dana nakon implantacije					
Vezivno tkivo dermisa	++	++	++	++	++
Vezivno tkivo hipodermisa	+	+	+	+	+
Vezivno tkivo kutanog mišića	+	+	+	+	+
Ukupni skor ekspresije kolagena tipa I (maksimalno 9)	4/9	4/9	4/9	4/9	4/9
15. dana nakon implantacije					
Vezivno tkivo dermisa	++	++	++	+++	++
Vezivno tkivo hipodermisa	+	+	+	++	+
Vezivno tkivo kutanog mišića	+	+	+	+	+
Ukupni skor ekspresije kolagena tipa I (maksimalno 9)	4/9	4/9	4/9	6/9	4/9
30. dana nakon implantacije					
Vezivno tkivo dermisa	++	++	++	++	++
Vezivno tkivo hipodermisa	+	+	+	+	+
Vezivno tkivo kutanog mišića	+	+	+	+	+
Ukupni skor ekspresije kolagena tipa I (maksimalno 9)	4/9	4/9	4/9	4/9	4/9
60. dana nakon implantacije					
Vezivno tkivo dermisa	++	++	++	++	++
Vezivno tkivo hipodermisa	+	+	+	+	+
Vezivno tkivo kutanog mišića	+	+	+	+	+
Ukupni skor ekspresije kolagena tipa I (maksimalno 9)	4/9	4/9	4/9	4/9	4/9

Tabela 5.27. Ekspresija kolagena tipa I u vezivnotkivnoj kapsuli oko implantata i perikapsularnom supkutano vezivnom tkivu kod aplikacije različitih hidrogelova tokom postoperativnog perioda praćenja

Vrsta hidrogela/ posmatrana struktura	Ekspresija kolagena tipa I u koži nakon implantacije različitih hidrogelova				
	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	Zona lažne operacije	Intaktna koža
7. dana nakon implantacije					
Kapsula oko implantata	+	+	+	∅	∅
Perikapsularno supkutano vezivno tkivo	+	+	+	∅	∅
15. dana nakon implantacije					
Kapsula oko implantata	+/+++	+/+++	+	∅	∅
Perikapsularno supkutano vezivno tkivo	++	++	+	∅	∅
30. dana nakon implantacije					
Kapsula oko implantata	+/+++	+/+++	+	∅	∅
Perikapsularno supkutano vezivno tkivo	++	++	+	∅	∅
60. dana nakon implantacije					
Kapsula oko implantata	+/+++	+/+++	+	∅	∅
Perikapsularno supkutano vezivno tkivo	++	++	+	∅	∅



Slika 5.44. Ekspresija kolagena tipa I u kontrolnoj intaktnoj koži i kutanom mišiću (levo), udaljenim od operativnog mesta, sa detaljem ekspresije u hipodermisu (desno), 7. dana posle operacije, IHH bojenje na Kol I, bar:200 μ m, slika levo; bar:100 μ m, slika desno.



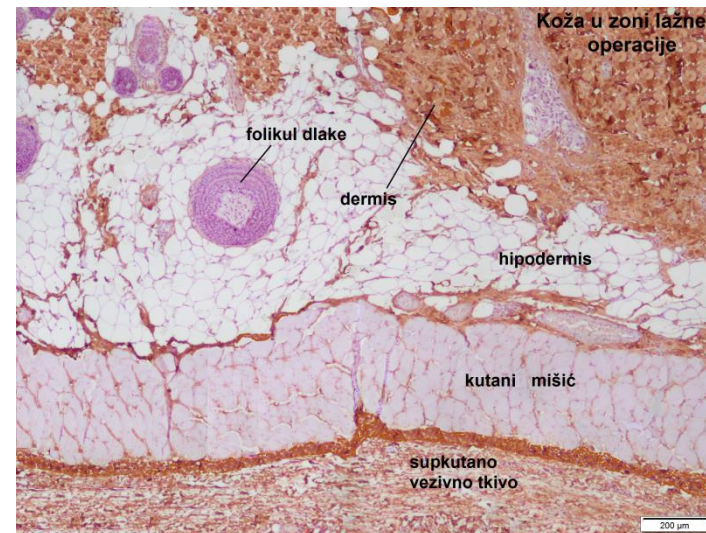
Slika 5.45. Ekspresija kolagena tipa I u koži u kojoj je supkutno implantiran Ag/PVA, 7. dana nakon implantacije (levo), IHH bojenje na Kol I, bar:200 μ m.

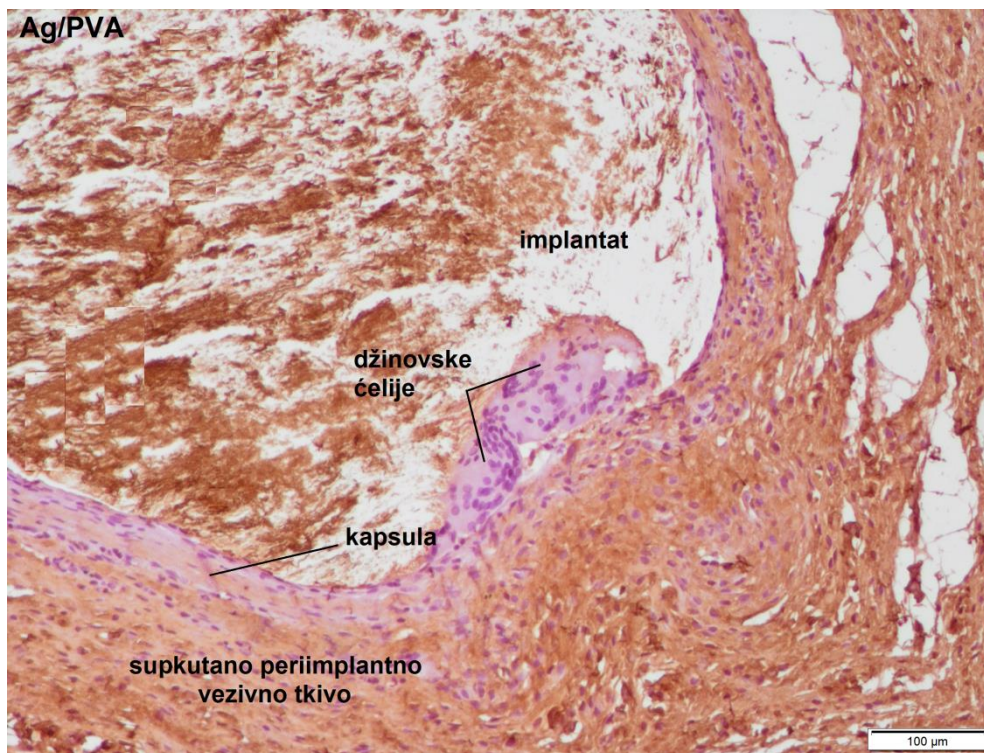
Slika 5.46. Ekspresija kolagena tipa I u koži u kojoj je supkutno implantiran Ag/PVA/Gr, 7. dana nakon implantacije (desno), IHH bojenje na Kol I, bar:200 μ m.



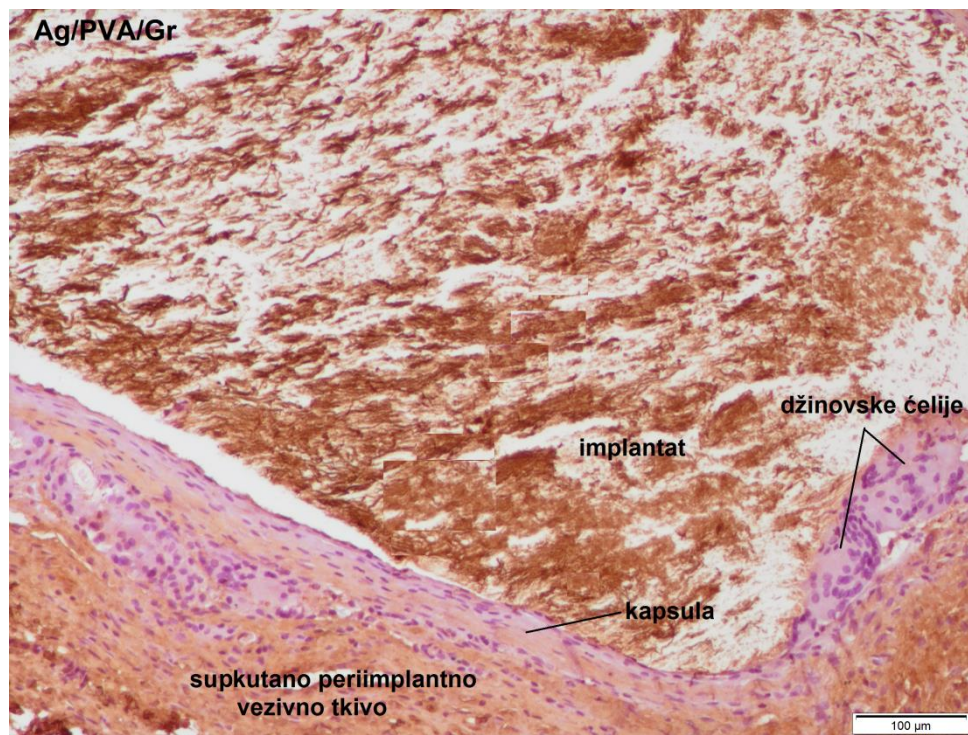
Slika 5.47. Ekspresija kolagena tipa I u koži u zoni lažne operacije, 15. dana nakon incizije, IHH bojenje na Kol I, bar:200µm, slike gore i dole desno; bar:100µm, slika dole levo.

Zapaziti izazitu ekspresiju kolagena tipa I u koži u mladom vezivnom tkivu u zoni incizije u kojoj nisu prisutni derivati epidermisa (slika gore, i detalj na slici dole levo), kao i ekspresiju u okolnom dermisu kože u neposrednoj blizini incizije (slika gore), hipodermisu i kutanom mišiću (detalj na slici dole desno).

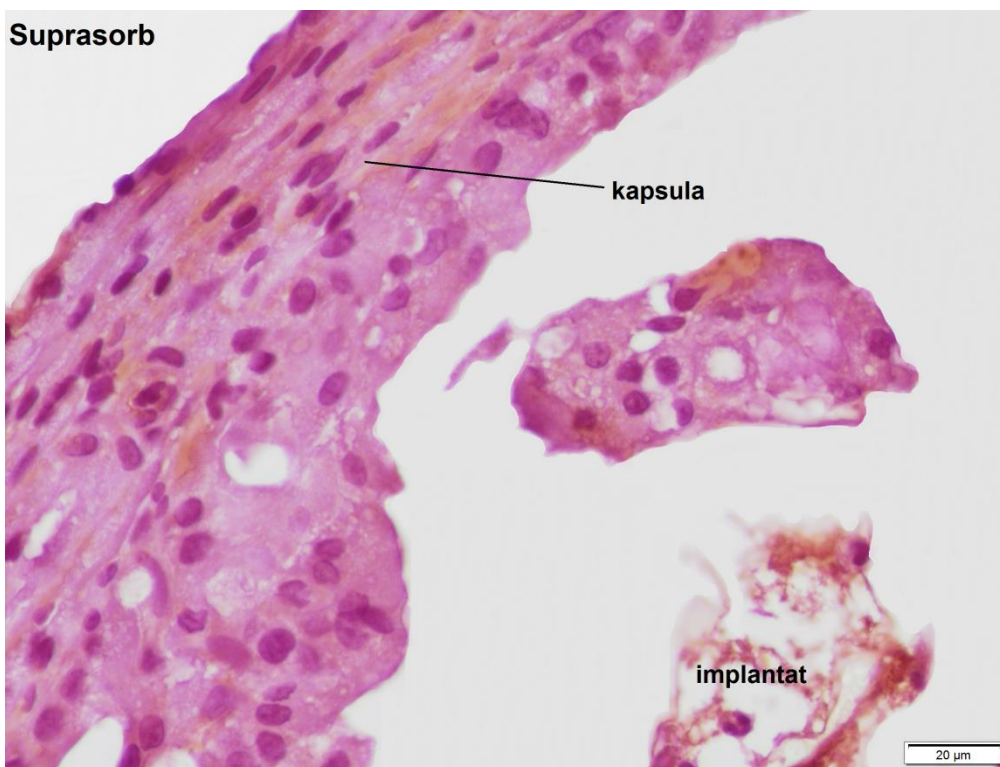
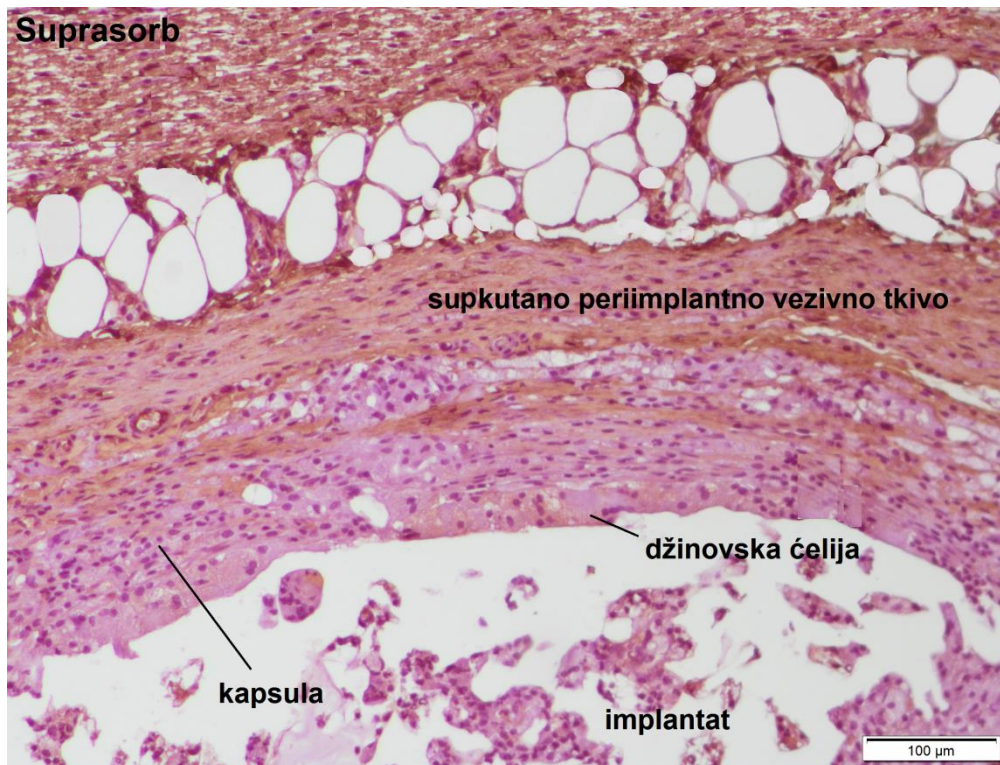




Slika 5.48. Ekspresija kolagena tipa I u kapsuli i supkutano periimplantno vezivno tkivo kod implantacije Ag/PVA, 15. postoperativnog dana, IHH bojenje na Kol I, bar:100µm.



Slika 5.49. Ekspresija kolagena tipa I u kapsuli i supkutano periimplantno vezivno tkivo kod implantacije Ag/PVA/Gr, 15. postoperativnog dana, IHH bojenje na Kol I, bar:100µm.



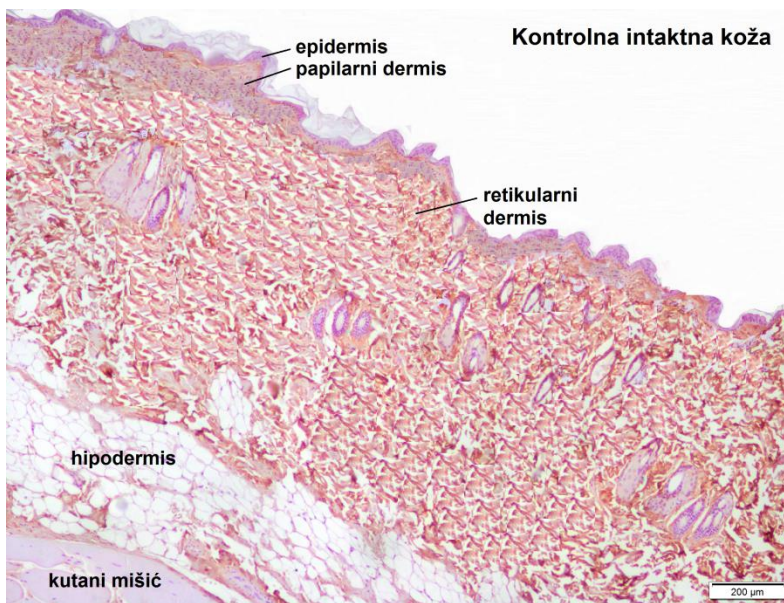
Slika 5.50. Ekspresija kolagena tipa I u kapsuli i supkutano periimplantnom vezivnom tkivu kod implantacije Suprasorba 15. postoperativnog dana (gore). Na donjoj slici je detalj kapsule sa fragmentima implantiranog Suprasorba, IHH bojenje na Kol I, bar:100μm, slika gore; bar:20μm, slika dole.

Tabela 5.28. Ekspresija kolagena tipa III u vezivnom tkivu kože i kutanog mišića kod aplikacije različitih hidrogelova tokom postoperativnog perioda praćenja

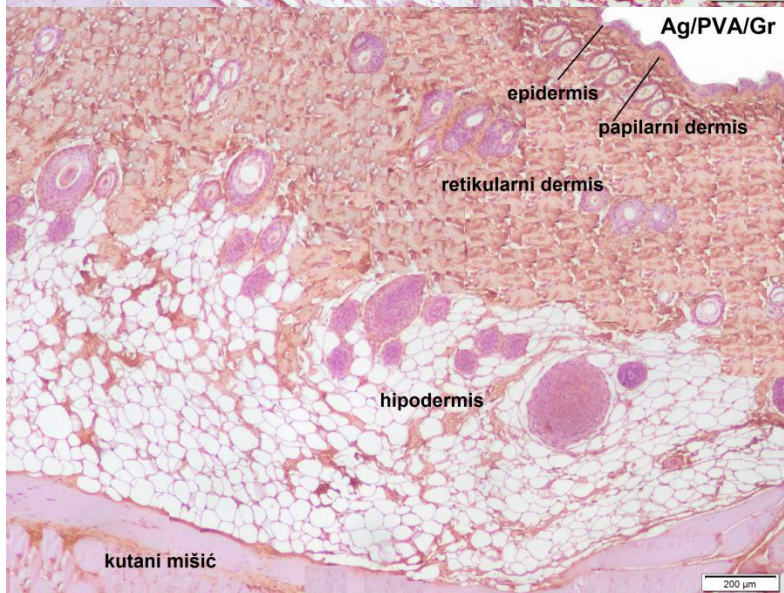
Vrsta hidrogela/ posmatrana struktura	Ekspresija kolagena tipa III u koži nakon implantacije različitih hidrogelova				
	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	Zona lažne operacije	Intaktna koža
7. dan nakon implantacije					
Vezivno tkivo dermisa	++	++	++	++	++
Vezivno tkivo hipodermisa	+	+	+	+	+
Vezivno tkivo kutanog mišića	+	+	+	+	+
Ukupni skor ekspresije koagena tipa I (maksimalno 9)	4/9	4/9	4/9	4/9	4/9
15. dan nakon implantacije					
Vezivno tkivo dermisa	++	++	++	+++	++
Vezivno tkivo hipodermisa	+	+	+	++	+
Vezivno tkivo kutanog mišića	+	+	+	+	+
Ukupni skor ekspresije koagena tipa I (maksimalno 9)	4/9	4/9	4/9	6/9	4/9
30. dan nakon implantacije					
Vezivno tkivo dermisa	++	++	++	++	++
Vezivno tkivo hipodermisa	+	+	+	+	+
Vezivno tkivo kutanog mišića	+	+	+	+	+
Ukupni skor ekspresije koagena tipa I (maksimalno 9)	4/9	4/9	4/9	4/9	4/9
60. dan nakon implantacije					
Vezivno tkivo dermisa	++	++	++	++	++
Vezivno tkivo hipodermisa	+	+	+	+	+
Vezivno tkivo kutanog mišića	+	+	+	+	+
Ukupni skor ekspresije koagena tipa I (maksimalno 9)	4/9	4/9	4/9	4/9	4/9

Tabela 5.29. Ekspresija kolagena tipa III u vezivnom tkivu kože i kutanog mišića kod aplikacije različitih hidrogelova tokom postoperativnog perioda praćenja

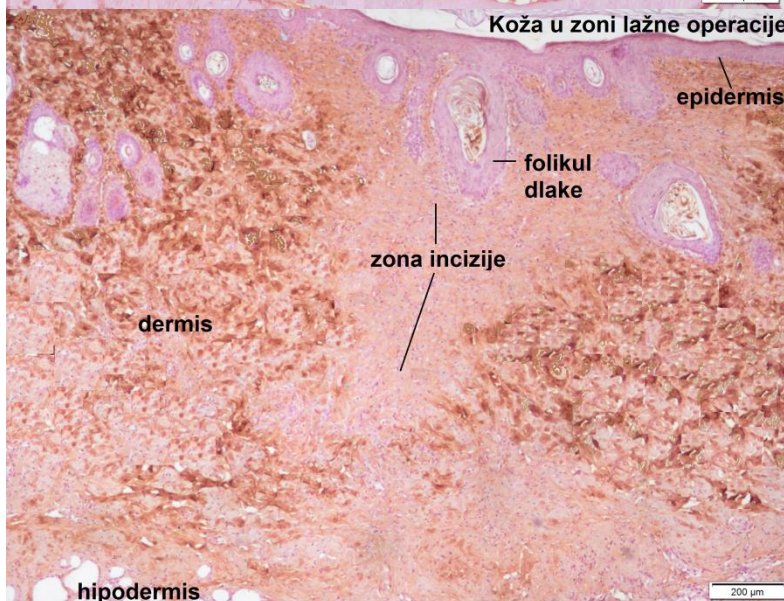
Vrsta hidrogela/ posmatrana struktura	Ekspresija kolagena tipa III u koži nakon implantacije različitih hidrogelova				
	Ag/PVA	Ag/PVA/Gr	Suprasorb	Zona lažne operacije	Intaktna koža
7. dana nakon implantacije					
Kapsula oko implantata	+	++	+	∅	∅
Perikapsularno supkutano vezivno tkivo	+	++	+	∅	∅
15. dana nakon implantacije					
Kapsula oko implantata	+	+	+	∅	∅
Perikapsularno supkutano vezivno tkivo	++	++	++	∅	∅
30. dana nakon implantacije					
Kapsula oko implantata	+	+	+	∅	∅
Perikapsularno supkutano vezivno tkivo	++	++	++	∅	∅
60. dana nakon implantacije					
Kapsula oko implantata	+	+	+	∅	∅
Perikapsularno supkutano vezivno tkivo	++	++	++	∅	∅



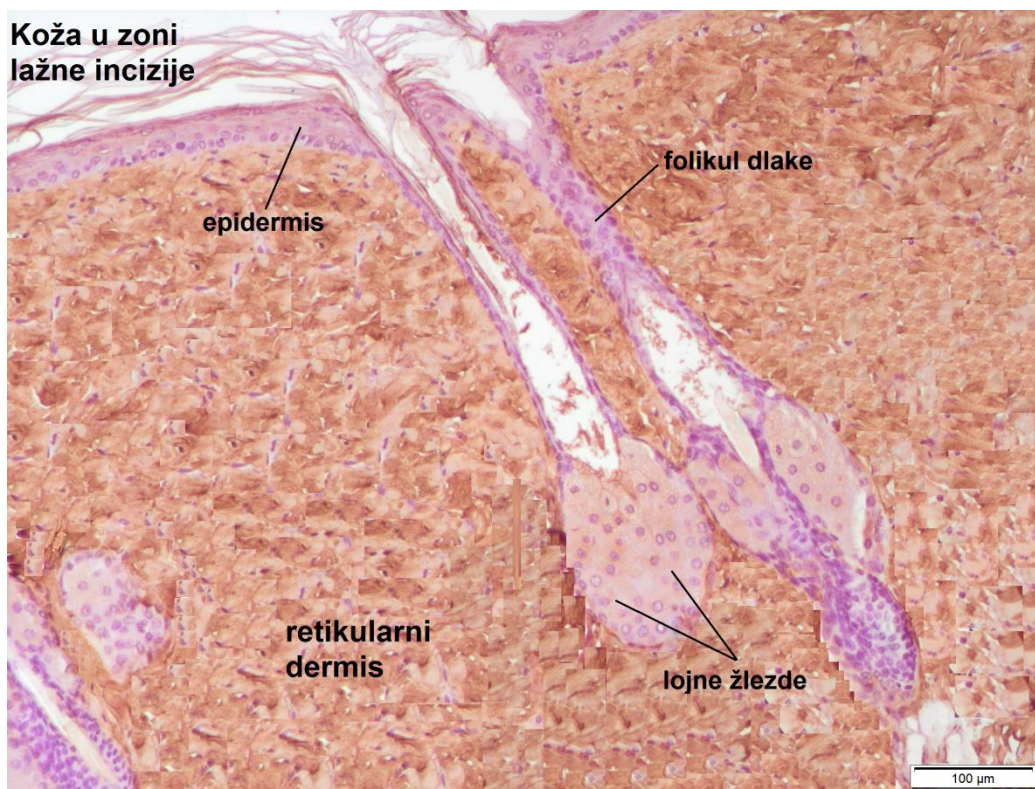
Slika 5.51. Ekspresija kolagena tipa III u uzorku intaktne kože, udaljene od zone implantacije, 15. postoperativnog dana, IHH bojenje na Kol III, bar:200µm.



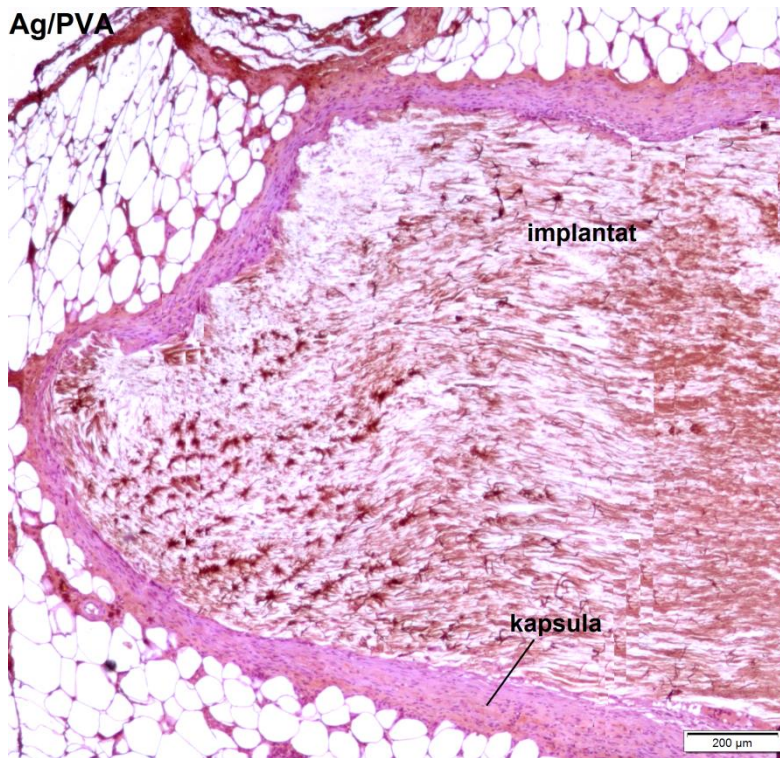
Slika 5.52. Ekspresija kolagena tipa III u uzorku kože sa supkutanom implantacijom Ag/PVA/Gr 15. postoperativnog dana, IHH bojenje na Kol III, bar:200µm.



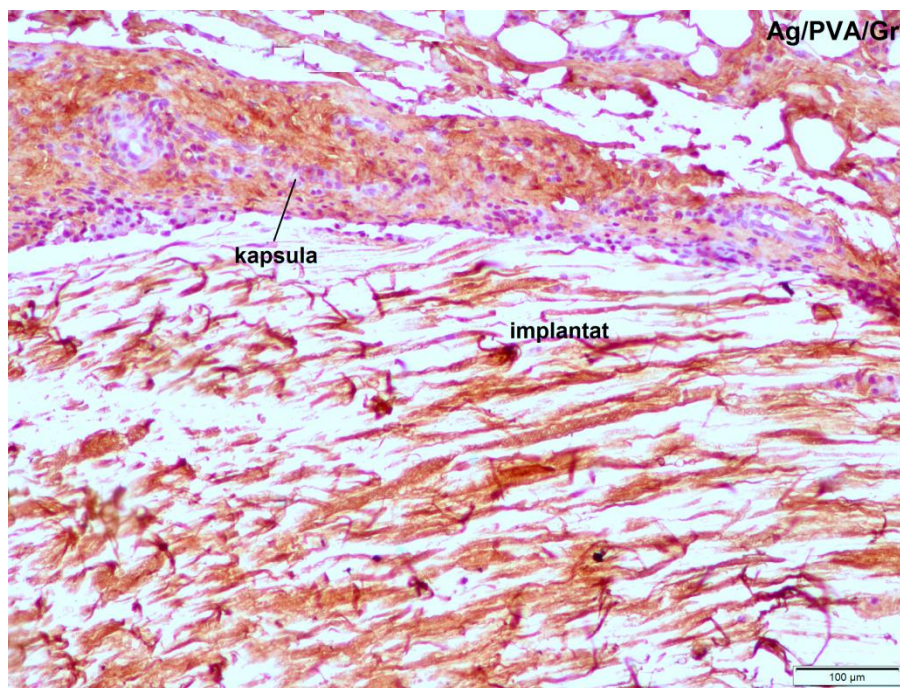
Slika 5.53. Ekspresija kolagena tipa III u uzorku kože u zoni lažne operacije 15. postoperativnog dana, IHH bojenje na Kol III, bar:200µm.



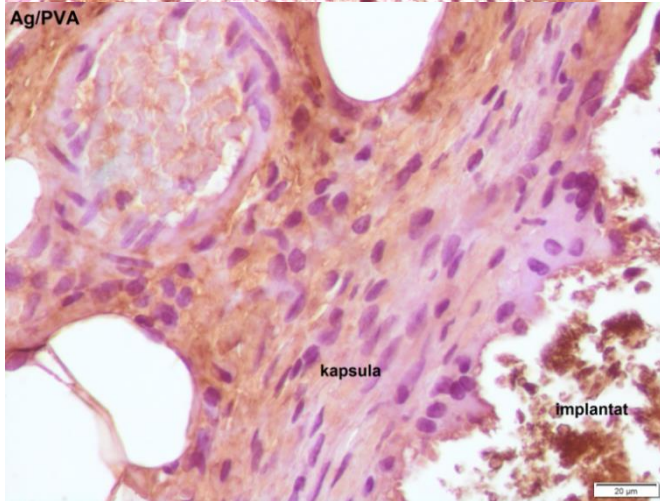
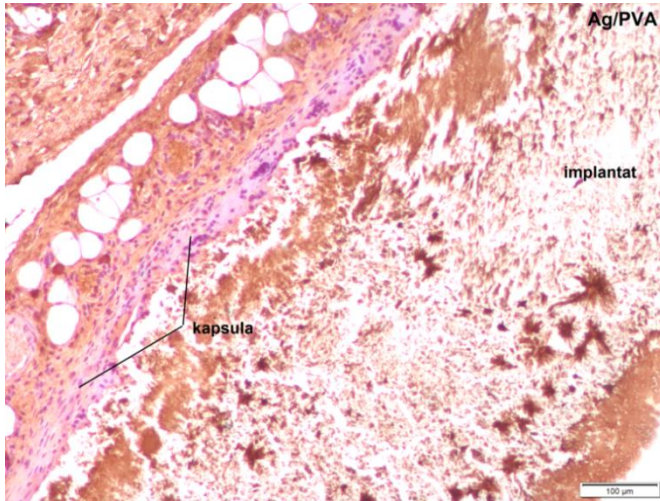
Slika 5.54. Ekspresija kolagena tipa III u uzorku kože u zoni lažne operacije 30. postoperativnog dana (gore). Detalj iz zone incizije sa potpuno regenerisanim folikulima dlake i lojnim žlezdama (dole), IHH bojenje na Kol III, bar:200, slika gore; bar:100µm, slika dole.



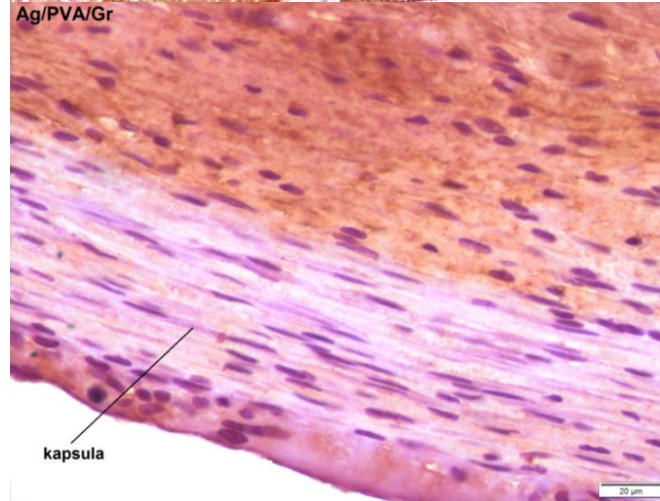
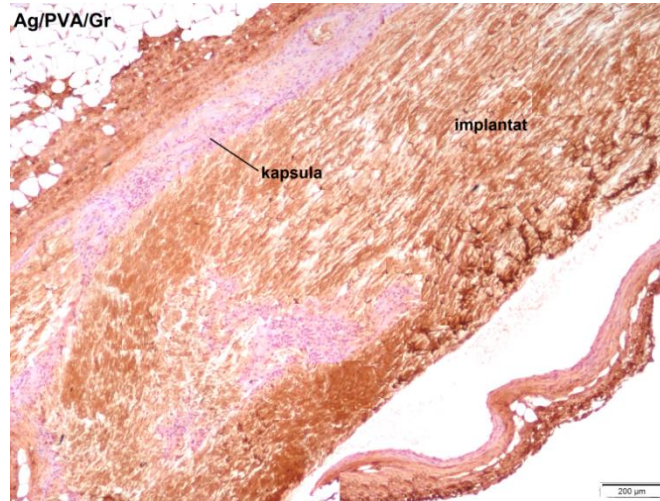
Slika 5.55. Ekspresija kolagena tipa III u kapsuli oko implantata od Ag/PVA, 7. dana nakon implantacije, IHH bojenje na Kol III, bar:200μm.



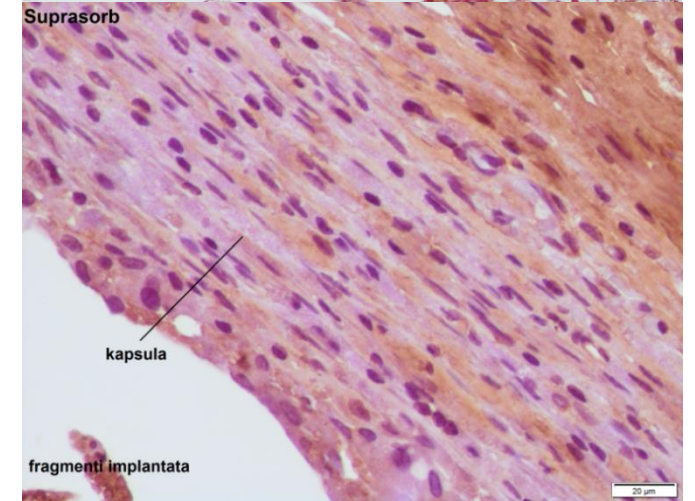
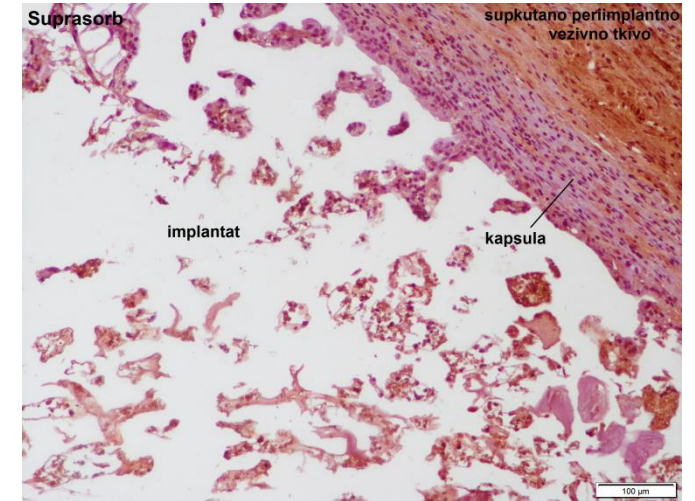
Slika 5.56. Ekspresija kolagena tipa III u kapsuli oko implantata od Ag/PVA/Gr, 7. dana nakon implantacije, IHH bojenje na Kol III, bar:100μm.



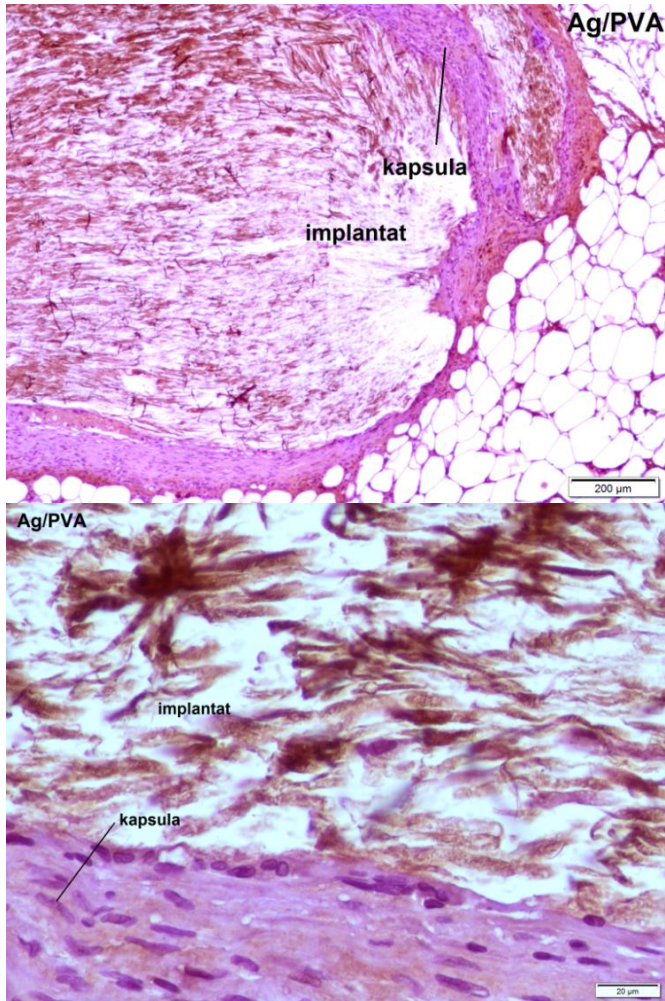
Slika 5.57. Kolagen III u kapsuli oko implantata (gore i dole), 15. dan nakon implantacije. Ag/PVA, bar:100μm, slika gore; bar:20μm, slika dole.



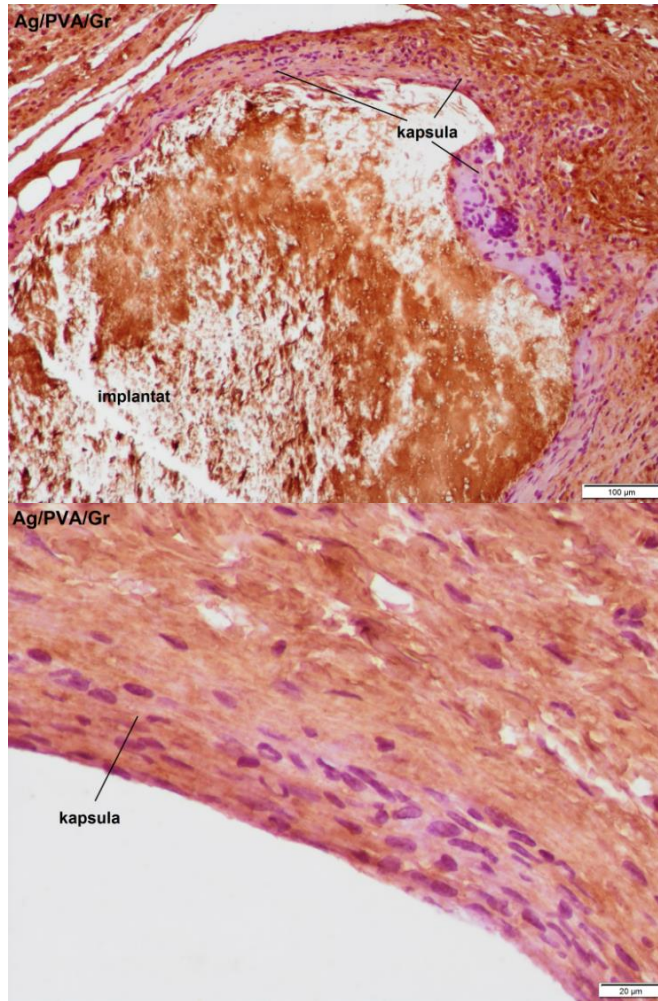
Slika 5.58. Kolagen III u kapsuli oko implantata (gore i dole), 15. dan nakon implantacije Ag/PVA/Gr, bar:200μm, slika gore; bar:20μm, slika dole.



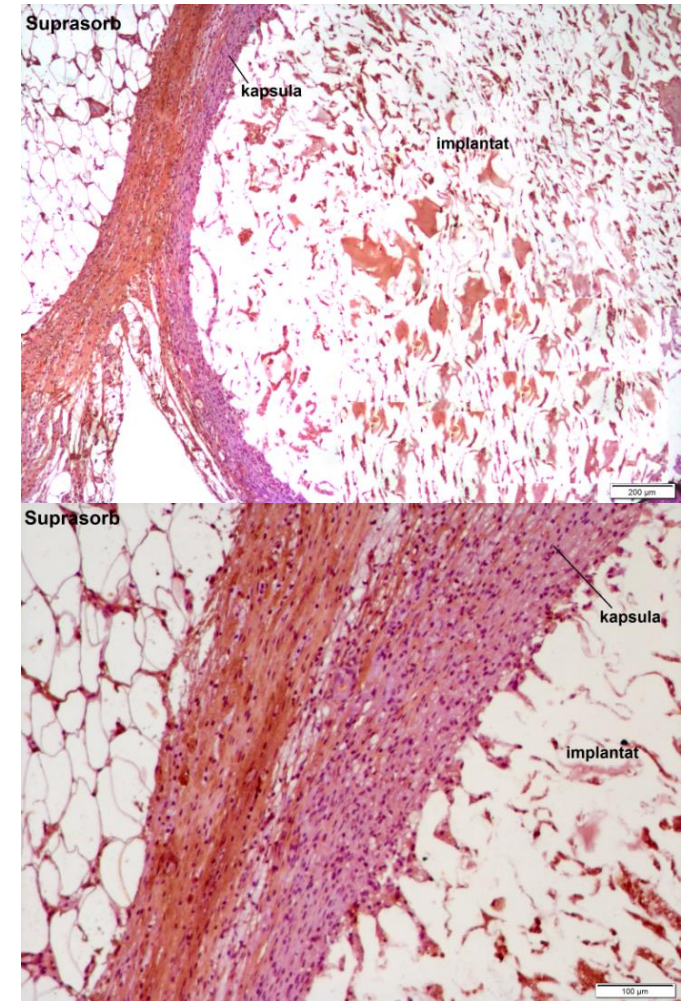
Slika 5.59. Kolagen III u kapsuli oko implantata (gore i dole), 15. dan nakon implantacije Suprasorba, bar:100μm, slika gore; bar:20μm, slika dole.



Slika 5.60. Kolagen III u kapsuli oko implantata (gore i dole), 30. dan nakon implantacije. Ag/PVA, bar:200µm, slika gore; bar:20µm, slika dole.



Slika 5.61. Kolagen III u kapsuli oko implantata (gore i dole), 30. dan nakon implantacije Ag/PVA/Gr, bar:100µm, slika gore; bar:20µm, slika dole.



Slika 5.62. Kolagen III u kapsuli oko implantata (gore i dole), 30. dan nakon implantacije Suprasorba, bar:200µm, slika gore; bar:100µm, slika dole.

5.2.4. Makrofagi u periimplantnoj zoni kod supkutane aplikacije Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba

Brojnost makrofaga u vezivnotkivnoj kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu kod supkutane implantacije različitih hidrogelova u različitim vremenskim terminima tokom postoperativnog perioda praćenja, prikazana je na grafikonima 5.8, 5.9 i 5.10. i tabeli 5.30.

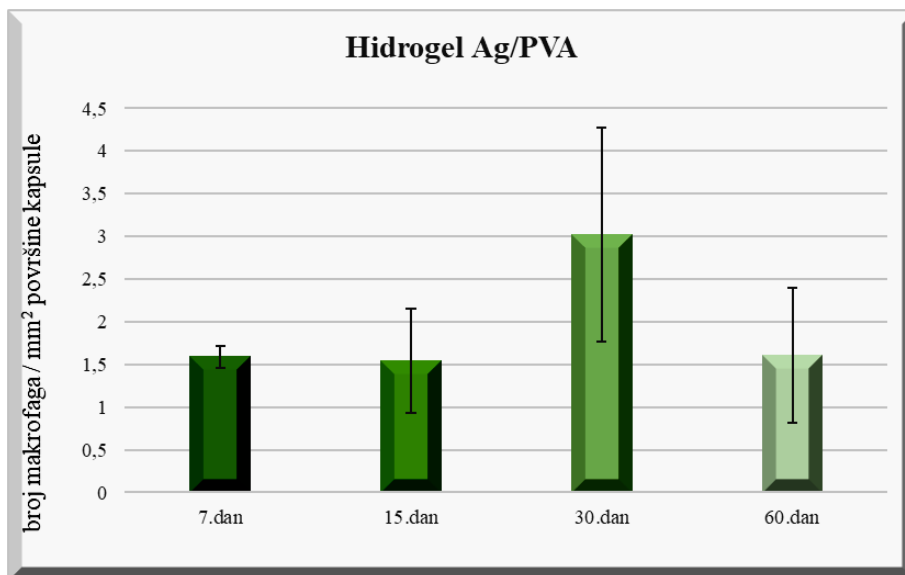
Statistički rezultati višestrukog poređenja broja makrofaga u vezivnotkivnoj kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu između aplikacije različitih hidrogelova (Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba) nakon 7, 15, 30. i 60. dana od operacije prikazani su u tabelama 5.31 i 5.32.

Rezultati brojnosti makrofaga u periimplantnoj zoni oko aplikovanih Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba dokumentovani su i slikama 5.63 do 5.75.

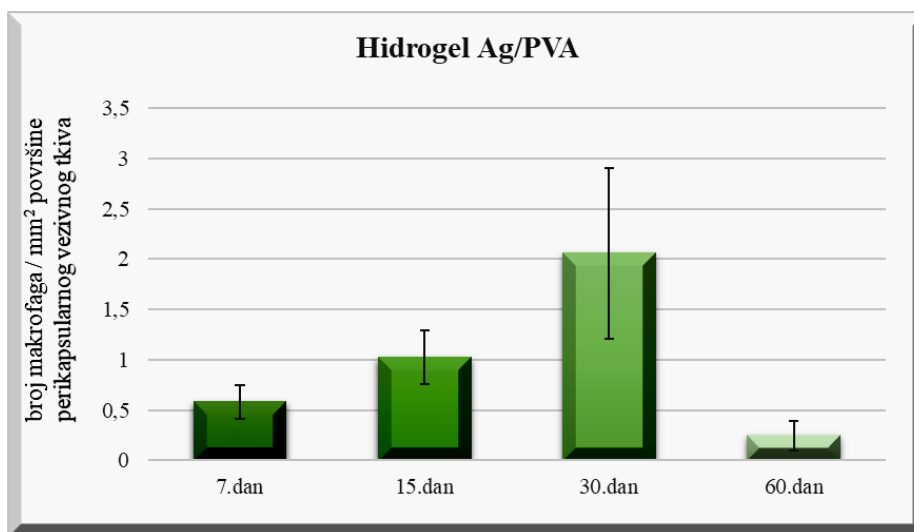
Brojnost makrofaga u svim posmatranim terminima u vezivnotkivnoj kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu bila je generalno najveća u slučaju supkutane aplikacije Suprasorba, u odnosu na aplikovane Ag/PVA i Ag/PVA/Gr. Brojnost makrofaga u kapsuli i perikapsularnoj zoni bila je najveća u slučaju aplikacije Suprasorba 7. postoperativnog dana, u poređenju sa ostala dva aplikovana hidrogela (sl. 5.63) i blago se smanjivala tokom perioda praćenja (sl. 5.72-5.75).

Takođe, kod svih aplikovanih hidrogelova kapsula je bila gušće infiltrirana makrofagima u odnosu na perikapsularnu zonu (tabela 5.30).

U slučaju aplikacije Ag/PVA, inicijalno manja gustina infiltracije makrofaga vezivnotkivne kapsule 7. i 15. postoperativnog dana, porasla je tako da su makrofagi 30. postoperativnog dana na sličan način infiltrirali kapsulu kao kod aplikacije Suprasorba. Međutim, takav trend nije se zadržao i u 60. postoperativnom danu, s obzirom da je gustina infiltracije makrofagima kapsule oko Ag/PVA bila značajno manja od iste kod aplikacije Suprasorba (sl. 5.64-5.67).

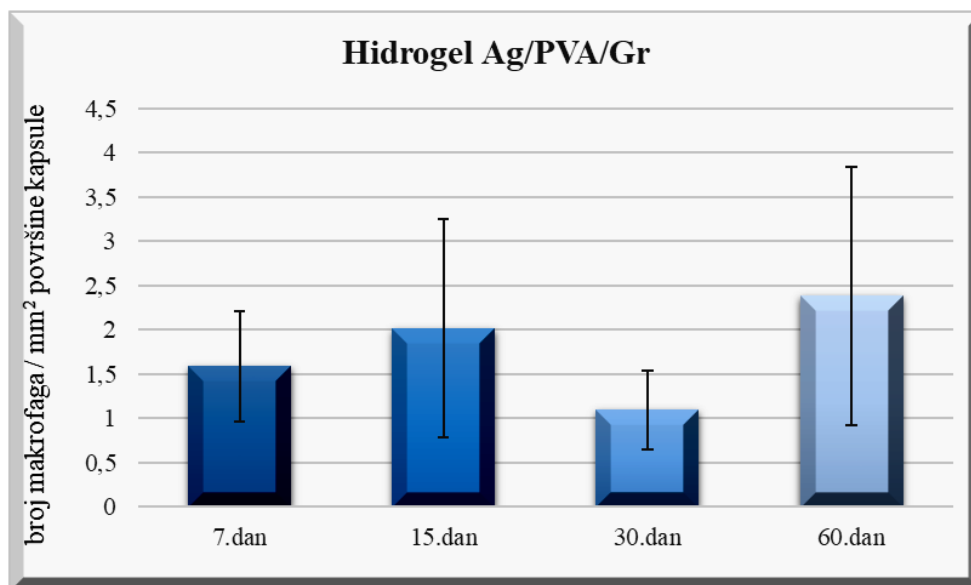


Bonferonijev test višestruke komparacije:
 7. dan:30. dan, $p<0,001$; 15. dan:30. danu, $p<0,001$; 30. dan: 60. danu, $p<0,001$.

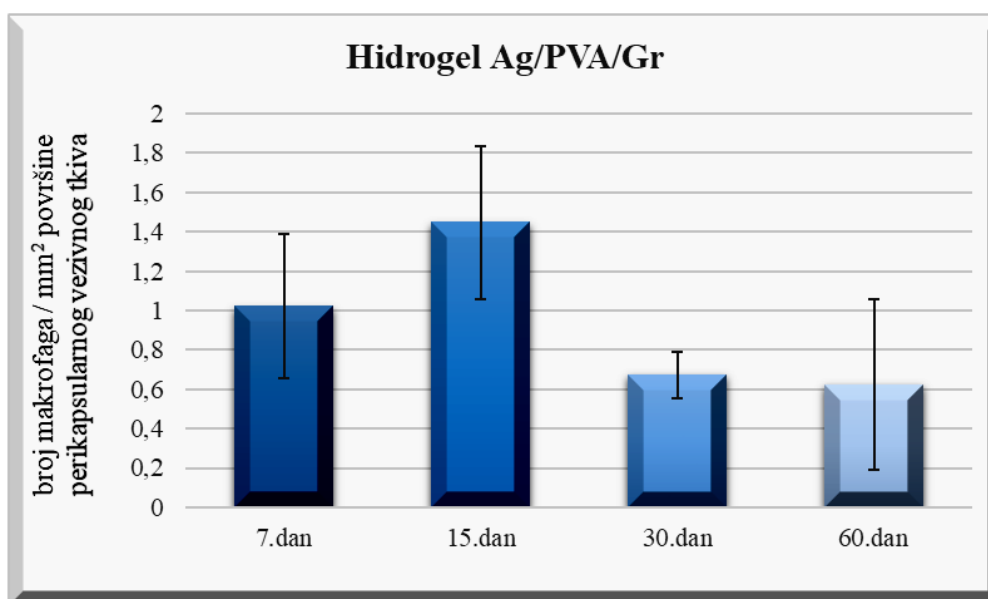


Bonferonijev test višestruke komparacije:
 7. dan:15. danu, $p=0,02$; 7. dan:30. danu, $p<0,001$; 15. dan: 30. danu, $p<0,001$;
 15. dan:60. danu, $p<0,001$; 30. dan:60. danu, $p<0,001$.

Grafikon 5.8. Broj makrofaga u vezivotkivnoj kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu u različitim vremenskim periodima praćenja, nakon supkutane implantacije Ag/PVA.

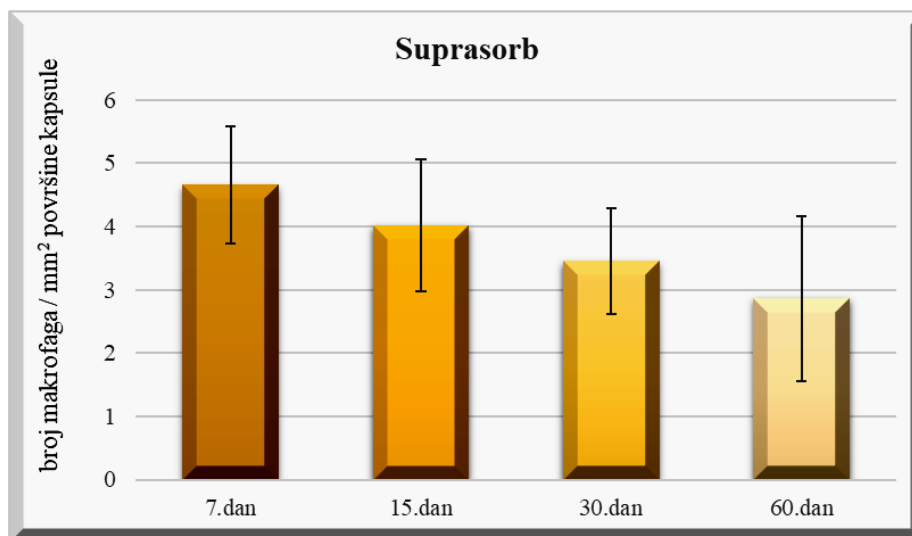


Bonferonijev test višestruke komparacije:
 15. dan:30. danu, $p=0,034$; 30.dan:60. danu, $p<0,001$.

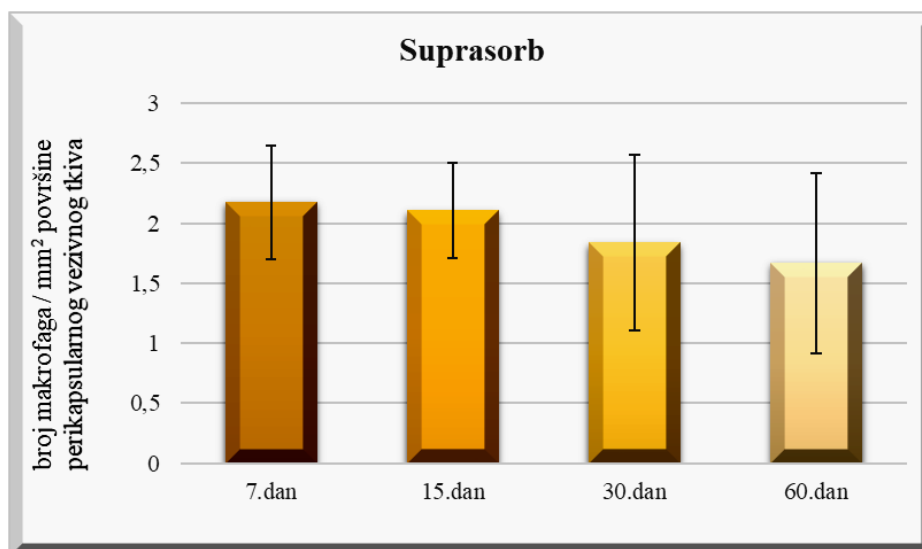


Bonferonijev test višestruke komparacije:
 7. dan:15. dan, $p<0,001$; 7. dan:30. danu, $p=0,014$; 7. dan: 60. danu, $p=0,003$;
 15. dan: 30. danu, $p<0,001$; 15.dan:60. danu, $p<0,001$;

Grafikon 5.9. Broj makrofaga u vezivnotkivnoj kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu u različitim vremenskim periodima praćenja, nakon supkutane implantacije Ag/PVA/Gr.



Bonferonijev test višestruke komparacije:
 7. dan:30. danu, $p=0,003$; 7. dan:60. danu, $p<0,001$; 30. dan:60. danu, $p=0,004$.



Bonferonijev test višestruke komparacije: nije bilo statističke razlike u br. makrofaga u perikapsularnoj zoni između različitih postoperativnih termina

Grafikon 5.10. Broj makrofaga u vezivnotkivnoj kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu u različitim vremenskim periodima praćenja, nakon supkutane implantacije Suprasorba.

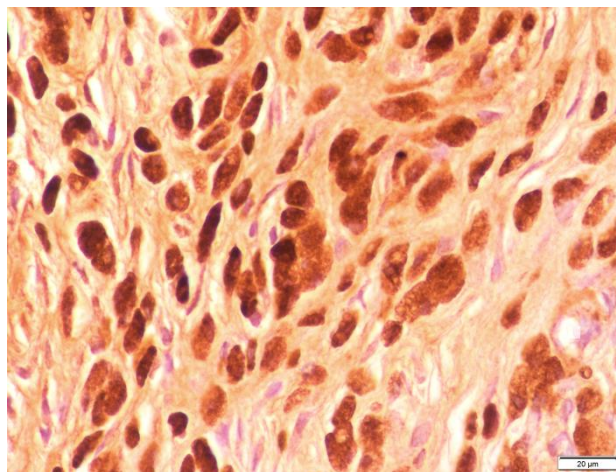
Tabela 5. 30. Statistička obrada podataka u vezi broja makrofaga u kapsuli i perikapsularnoj zoni kod implantacije Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba, nakon 7. (1), 15. (2), 30. (3) i 60. (4) dana od operacije.

Ag/PVA		Merenje	kapsula	perikapsul. zona	t-test
1	Mean*	1.5900	0.5810	<0,001	
	N	20	20		
	Std. Deviation	0.12641	0.17051		
2	Mean	1.5605	1.0230	0,001	
	N	21	20		
	Std. Deviation	0.60806	0.26772		
3	Mean	2.9500	2.0570	0,011	
	N	21	20		
	Std. Deviation	1.25417	0.85079		
4	Mean	1.6080	0.2455	<0,001	
	N	20	20		
	Std. Deviation	0.79128	0.14877		
Total	Mean	1.9351	0.9766		
	N	82	80		
	Std. Deviation	0.99476	0.82136		
Ag/PVA/Gr		Merenje	kapsula	perikapsul zona	t-test
1	Mean*	1.5905	1.0205	0,001	
	N	20	20		
	Std. Deviation	0.62211	0.36638		
2	Mean	2.0170	1.4460	0,055	
	N	20	20		
	Std. Deviation	1.22766	0.38831		
3	Mean	1.0945	0.6735	<0,001	
	N	20	20		
	Std. Deviation	0.44731	0.11882		
4	Mean	2.3815	0.6220	<0,001	
	N	20	20		
	Std. Deviation	1.45325	0.43273		
Total	Mean	1.7709	0.9405		
	N	80	80		
	Std. Deviation	1.11598	0.47647		

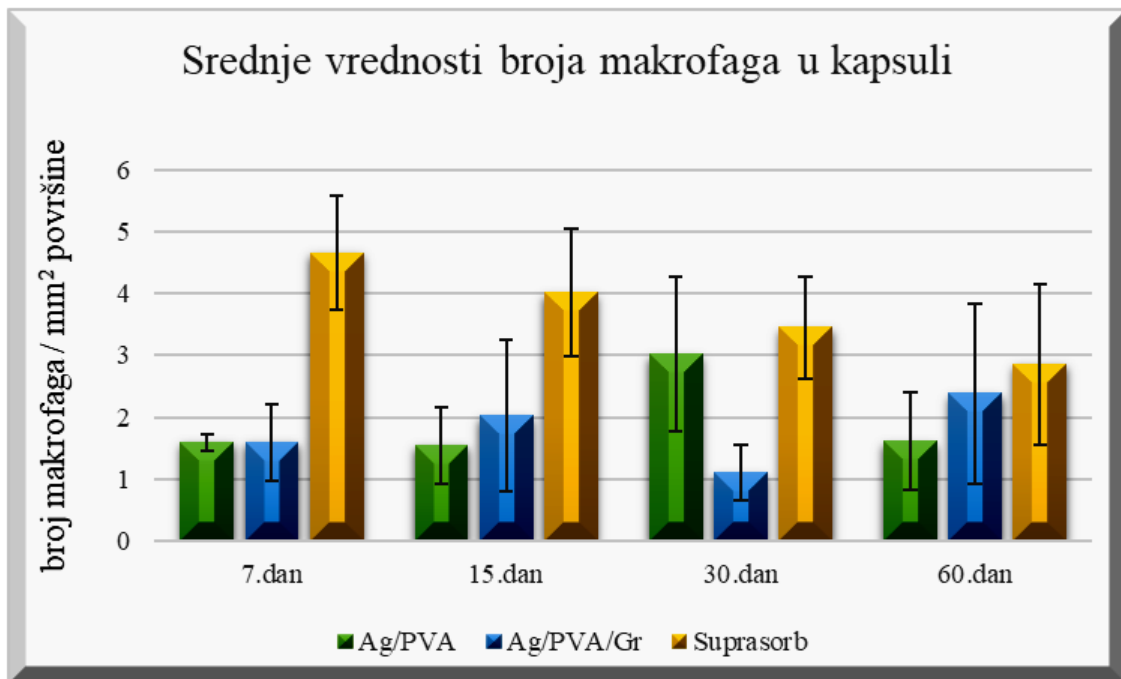
Suprasorb

Merenje		kapsula	perikapsul.. zona	t-test
1	Mean*	4.6510	2.1743	0,01
	N	20	21	
	Std. Deviation	0.92450	0.47553	
2	Mean	4.0140	2.1045	0,01
	N	20	20	
	Std. Deviation	1.03762	0.39677	
3	Mean	3.4470	1.8390	0,01
	N	20	20	
	Std. Deviation	0.83446	0.72904	
4	Mean	2.8591	1.6680	0,01
	N	20	20	
	Std. Deviation	1.29691	0.74793	
Total	Mean	3.7428	1.9493	
	N	80	81	
	Std. Deviation	1.21811	0.62860	

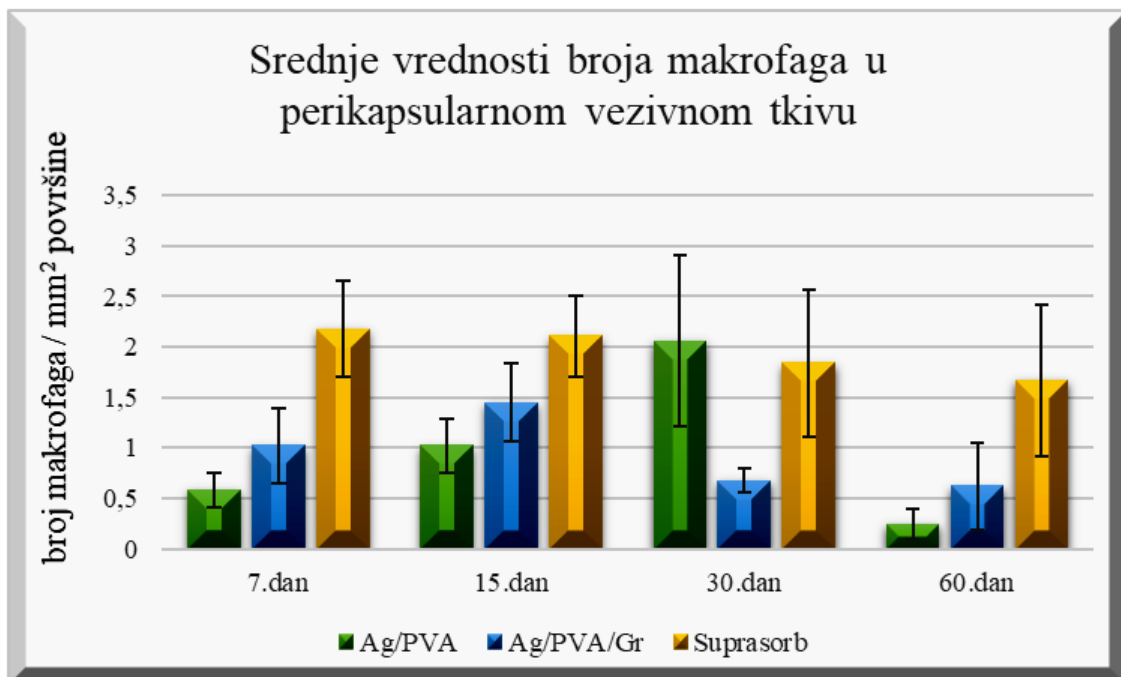
*srednja vrednost data je kao broj makrofaga na mm² posmatrane površine.



Slika 5.63. Makrofagi u kapsuli i perikapsularnoj zoni kod implantacije Suprasorba, 7. dana nakon operacije, IHH bojenje na CD68, bar:20μm.



Grafikon 5.11. Broj makrofaga u kapsularnom vezivnom tkivu oko implantata od Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba, u različitim vremenskim periodima nakon implantacije hidrogelova.



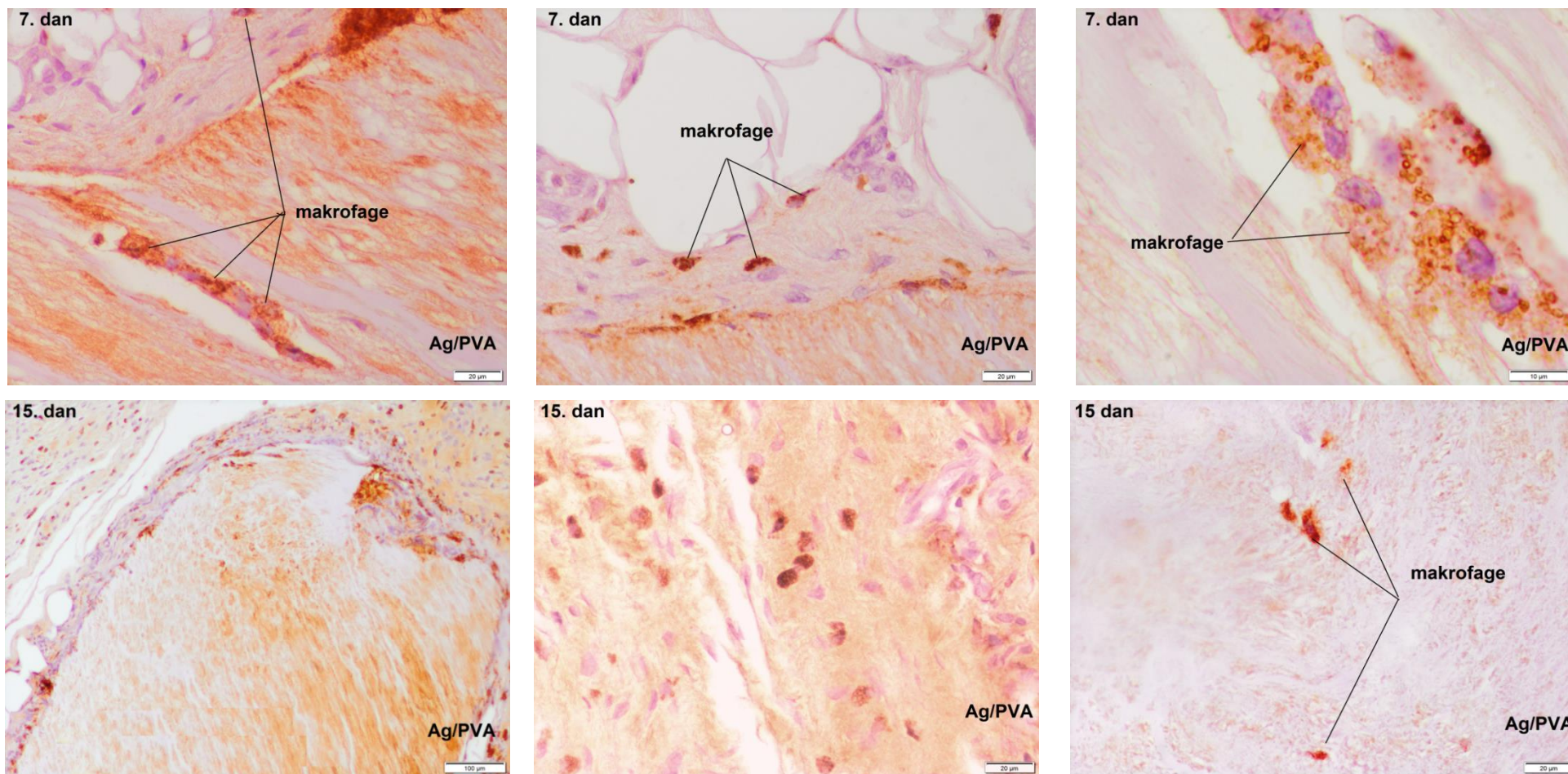
Grafikon 5.12. Broj makrofaga u perikapsularnom vezivnom tkivu oko implantata od Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba, u različitim vremenskim periodima nakon implantacije hidrogelova.

Tabela 5.31. Statistički rezultati poređenja broja makrofaga u kapsuli između različitih hidrogelova, tokom različitih vremenskih termina praćenja u postoperativnom periodu

Multiple Comparisons							
Bonferroni							
Dependent Variable	(I) podloge	(J) podloge	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
kapsula 7. dan	1 Ag/PVA	2	-0.00050	0.20475	1.000	-0.5056	0.5046
		3	-3.06100*	0.20475	<0.001	-3.5661	-2.5559
	2 Ag/PVA/Gr	1	0.00050	0.20475	1.000	-0.5046	0.5056
		3	-3.06050*	0.20475	<0.001	-3.5656	-2.5554
	3 Suprasorb	1	3.06100*	0.20475	<0.001	2.5559	3.5661
		2	3.06050*	0.20475	<0.001	2.5554	3.5656
kapsula 15. dan	1 Ag/PVA	2	-0.45652	0.30834	0.432	-1.2167	0.3037
		3	-2.45352*	0.30834	<0.001	-3.2137	-1.6933
	2 Ag/PVA/Gr	1	0.45652	0.30834	0.432	-0.3037	1.2167
		3	-1.99700*	0.31208	<0.001	-2.7664	-1.2276
	3 Suprasorb	1	2.45352*	0.30834	<0.001	1.6933	3.2137
		2	1.99700*	0.31208	<0.001	1.2276	2.7664
kapsula 30. dan	1 Ag/PVA	2	1.85550*	0.28568	<0.001	1.1512	2.5598
		3	-0.49700	0.28568	0.262	-1.2013	0.2073
	2 Ag/PVA/Gr	1	-1.85550*	0.28568	<0.001	-2.5598	-1.1512
		3	-2.35250*	0.28914	<0.001	-3.0654	-1.6396
	3 Suprasorb	1	0.49700	0.28568	0.262	-0.2073	1.2013
		2	2.35250*	0.28914	<0.001	1.6396	3.0654
kapsula 60. dan	1 Ag/PVA	2	-0.77350	0.38384	0.146	-1.7203	0.1733
		3	-1.25110*	0.38384	0.006	-2.1979	-0.3043
	2 Ag/PVA/Gr	1	0.77350	0.38384	0.146	-0.1733	1.7203
		3	-0.47760	0.38384	0.655	-1.4244	0.4692
	3 Suprasorb	1	1.25110*	0.38384	0.006	0.3043	2.1979
		2	0.47760	0.38384	0.655	-0.4692	1.4244

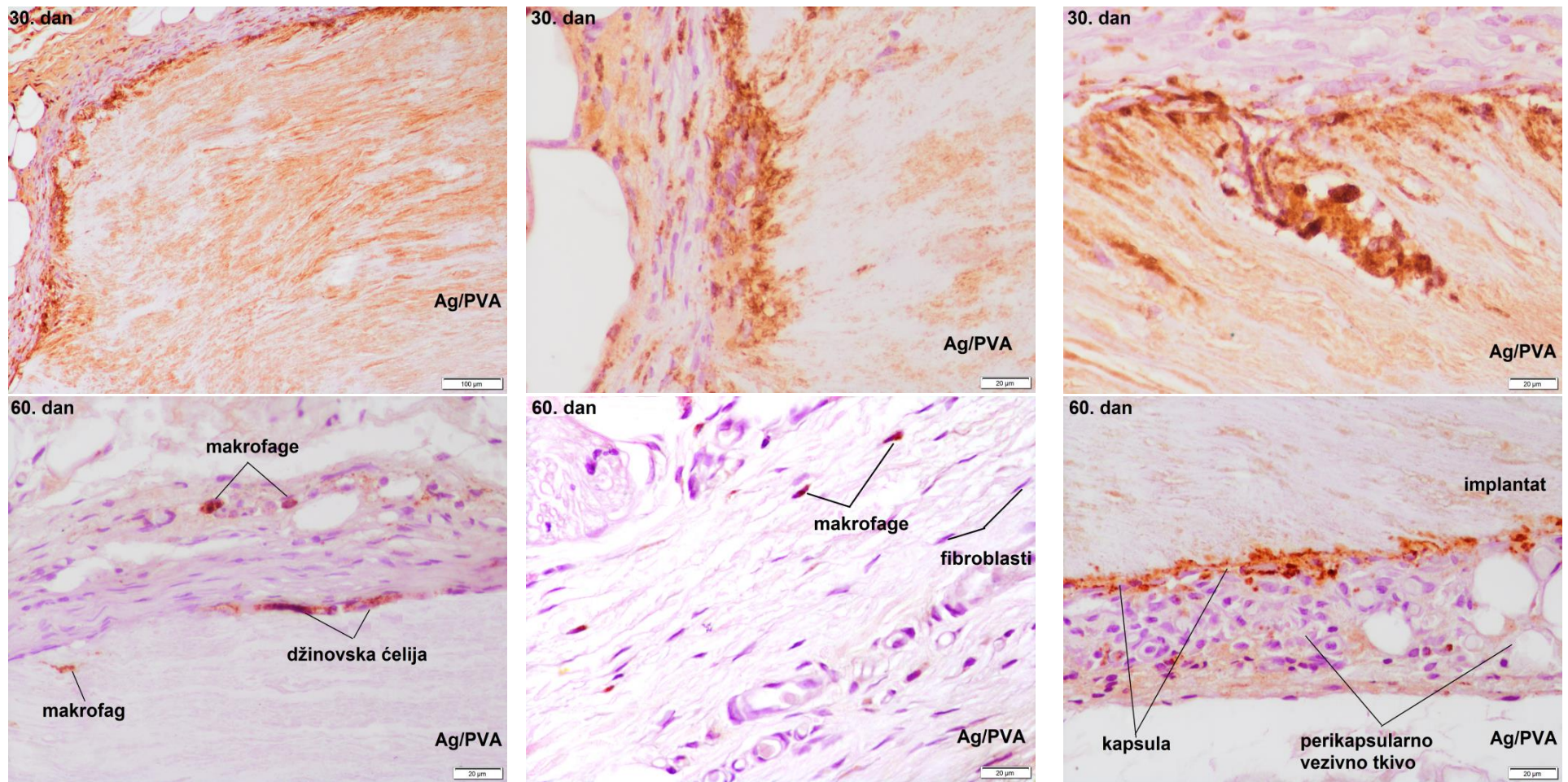
Tabela 5.32. Statistički rezultati poređenja broja makrofaga u perikapsularnoj zoni između različitih hidrogelova, tokom različitih vremenskih termina praćenja u postoperativnom periodu.

Multiple Comparisons							
Bonferroni							
Dependent Variable	(I) podloge	(J) podloge	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Perikapsul. zona 7. dan	1 Ag/PVA	2	-0.43950*	0.11466	0.001	-0.7222	-0.1568
		3	-1.59329*	0.11329	<0.001	-1.8726	-1.3140
	2 Ag/PVA/Gr	1	0.43950*	0.11466	0.001	0.1568	0.7222
		3	-1.15379*	0.11329	<0.001	-1.4331	-0.8745
	3 Suprasorb	1	1.59329*	0.11329	<0.001	1.3140	1.8726
		2	1.15379*	0.11329	<0.001	0.8745	1.4331
Perikapsul. zona 15. dan	1 Ag/PVA	2	-0.42300*	0.11253	0.001	-0.7006	-0.1454
		3	-1.08150*	0.11253	<0.001	-1.3591	-0.8039
	2 Ag/PVA/Gr	1	0.42300*	0.11253	0.001	0.1454	0.7006
		3	-0.65850*	0.11253	<0.001	-0.9361	-0.3809
	3 Suprasorb	1	1.08150*	0.11253	<0.001	0.8039	1.3591
		2	0.65850*	0.11253	<0.001	0.3809	0.9361
Perikapsul. zona 30. dan	1 Ag/PVA	2	1.38350*	0.20571	<0.001	0.8761	1.8909
		3	0.21800	0.20571	0.881	-0.2894	0.7254
	2 Ag/PVA/Gr	1	-1.38350*	0.20571	<0.001	-1.8909	-0.8761
		3	-1.16550*	0.20571	<0.001	-1.6729	-0.6581
	3 Suprasorb	1	-0.21800	0.20571	0.881	-0.7254	0.2894
		2	1.16550*	0.20571	<0.001	0.6581	1.6729
Perikapsul. zona 60. dan	1 Ag/PVA	2	-0.37650	0.16008	0.066	-0.7714	0.0184
		3	-1.42250*	0.16008	<0.001	-1.8174	-1.0276
	2 Ag/PVA/Gr	1	0.37650	0.16008	0.066	-0.0184	0.7714
		3	-1.04600*	0.16008	<0.001	-1.4409	-0.6511
	3 Suprasorb	1	1.42250*	0.16008	<0.001	1.0276	1.8174
		2	1.04600*	0.16008	<0.001	0.6511	1.4409



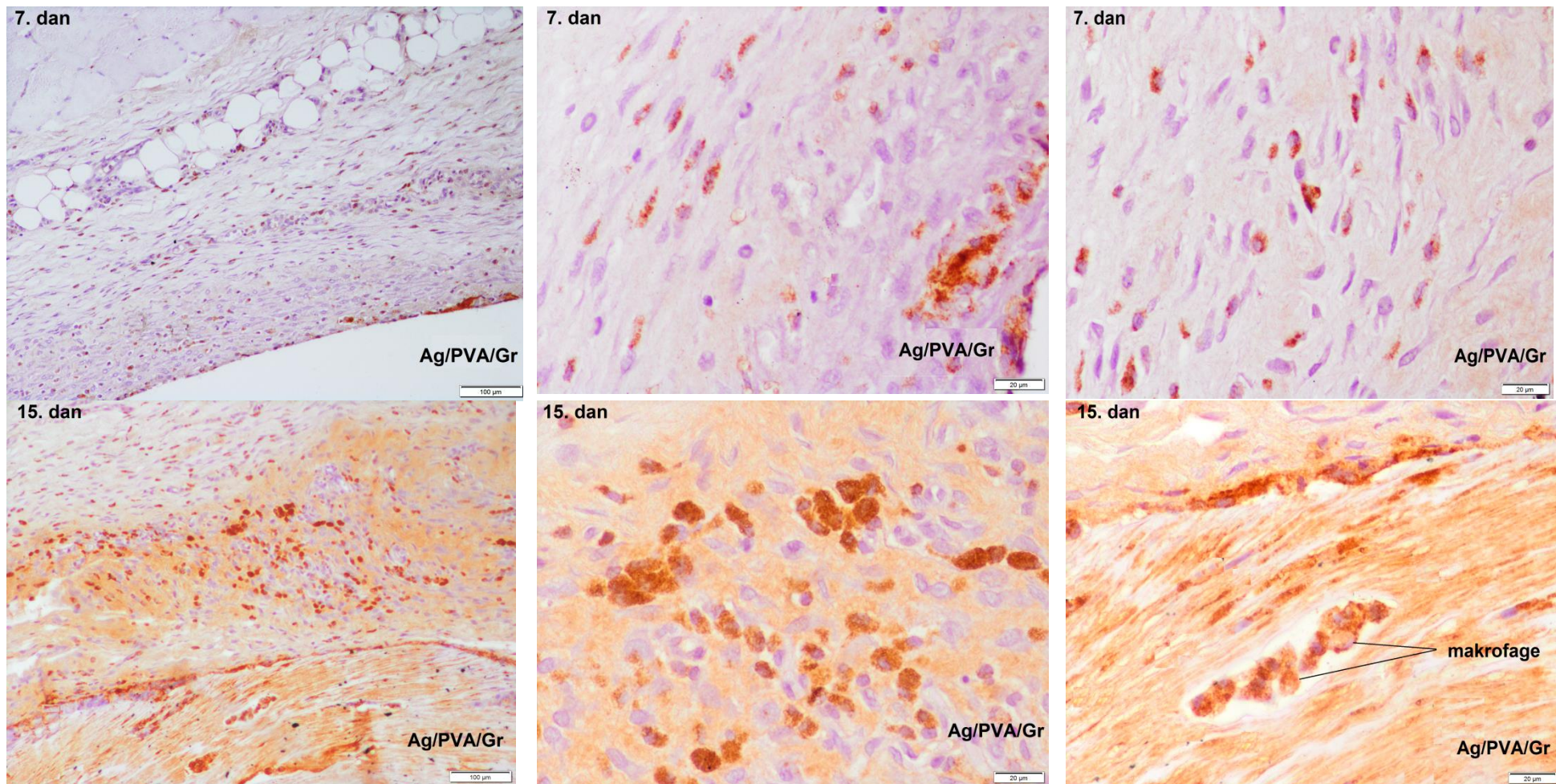
Slika 5.64 (gore). Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu (levo i u sredini), kao i u implantatu (desno), kod implantacije Ag/PVA, 7. dana nakon operacije. IHH bojenje na CD68, bar:20 μ m.

Slika 5.65 (dole). Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu (levo i u sredini), kao i u implantatu (desno), kod implantacije Ag/PVA, 15. dana nakon operacije. IHH bojenje na CD68, bar:100 μ m, slika levo; bar:20 μ m, slike u sredini i desno.



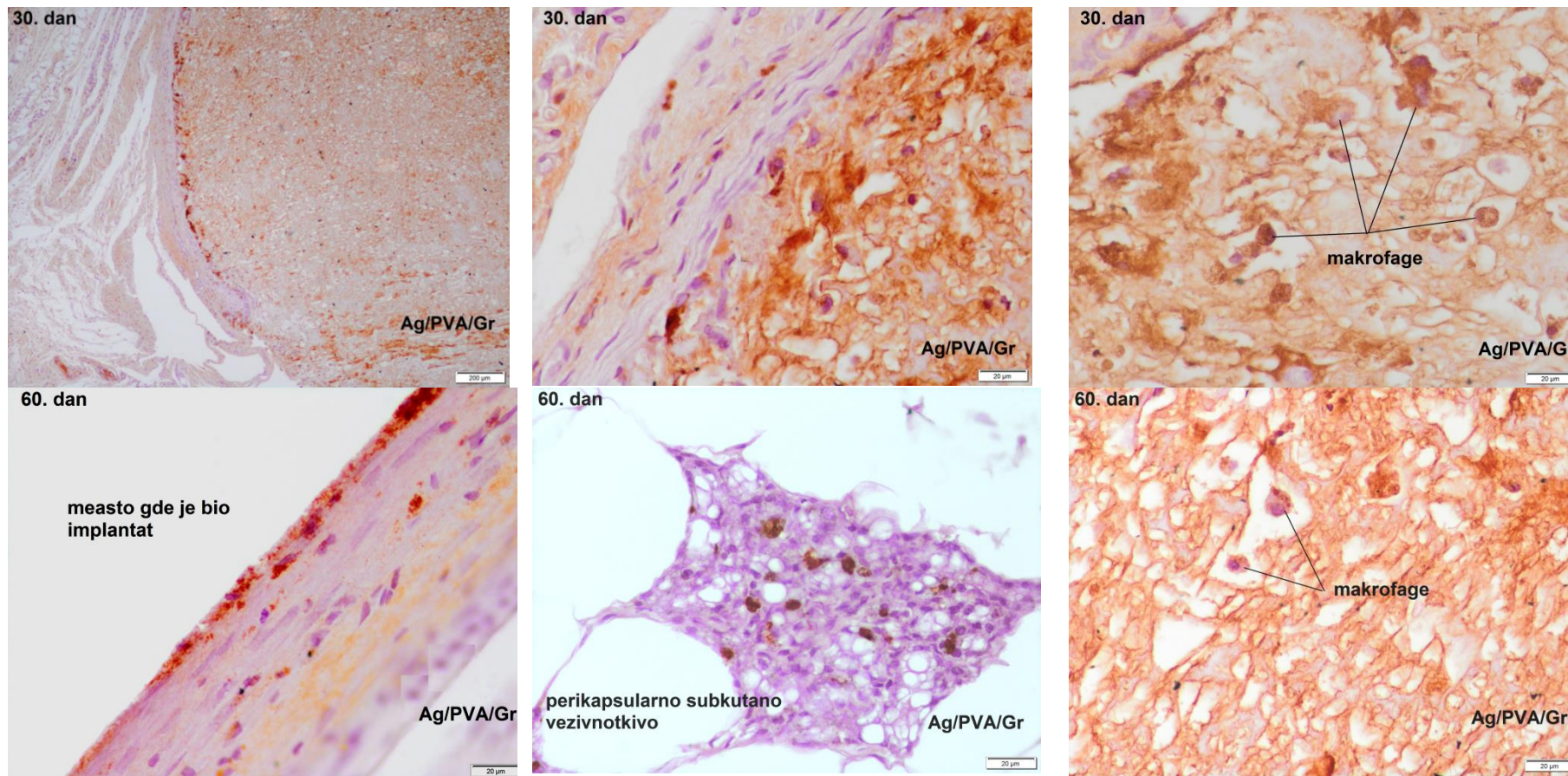
Slika 5.66 (gore). Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu (levo i u sredini), kao i u implantatu (desno), kod implantacije Ag/PVA, 30. dana nakon operacije. IHH bojenje na CD68, bar:100µm, slika levo; bar:20µm, slike u sredini i desno.

Slika 5.67 (dole). Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu (levo i u sredini), kao i u implantatu (desno), kod implantacije Ag/PVA, 60. dana nakon operacije. IHH bojenje na CD68 bar:20µm.



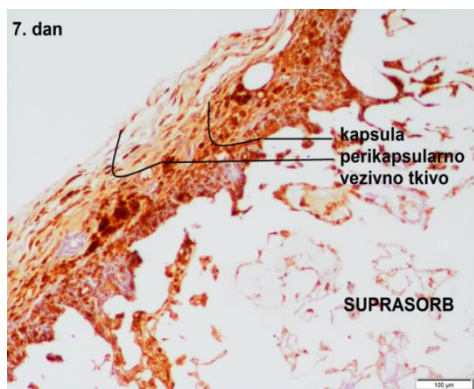
Slika 5.68 (gore). Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu (levo, u sredini i desno), kod implantacije Ag/PVA/Gr, 7. dana nakon operacije. IHH bojenje na CD68, bar:100 μ m, slika levo; bar:20 μ m, slike u sredini i desno.

Slika 5.69 (dole). Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu (levo i u sredini), kao i u implantatu (desno), kod implantacije Ag/PVA/Gr, 15. dana nakon operacije. IHH bojenje na CD68, bar:100 μ m, slika levo; bar:20 μ m, slike u sredini i desno

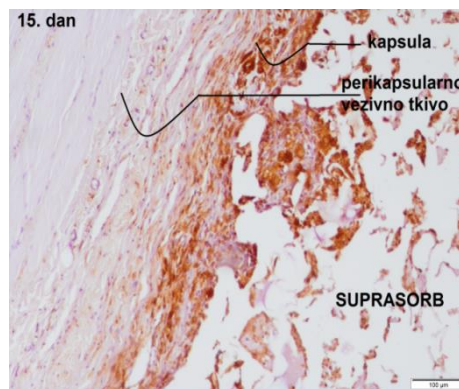


Slika 5.70 (gore). Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu (levo i u sredini), kao i u implantatu (desno), kod implantacije Ag/PVA/Gr, 30. dana nakon operacije. IHH bojenje na CD68, bar:200 μ m, slika levo; bar:20 μ m, slike u sredini i desno

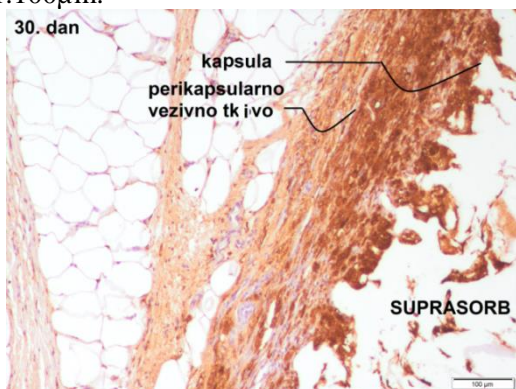
Slika 5.71 (dole). Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu (levo i u sredini), kao i u implantatu (desno), kod implantacije Ag/PVA/Gr, 60. dana nakon operacije. IHH bojenje na CD68, bar:20 μ m.



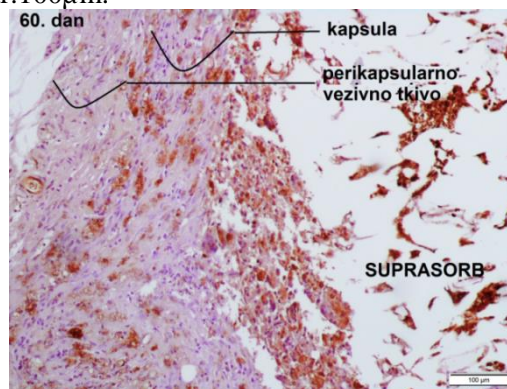
Sl. 5.72. Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu kod implantacije Suprasorba 7. postoperativnog dana. IHH bojenje na CD68, bar:100µm.



Sl. 5.73. Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu kod implantacije Suprasorba 15. postoperativnog dana. IHH bojenje na CD68, bar:100µm.



Sl. 5.74. Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu kod implantacije Suprasorba 30. postoperativnog dana. IHH bojenje na CD68, bar:100µm.

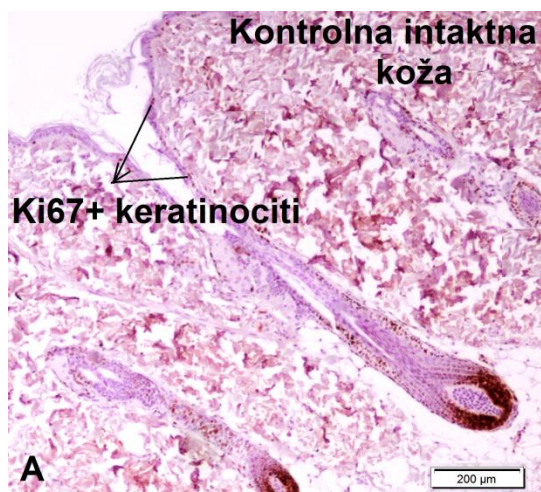


Sl. 5.75. Makrofagi u kapsuli i perikapsularnom vezivnom tkivu kod implantacije Suprasorba 60. postoperativnog dana. IHH bojenje na CD68, bar:100µm.

Iako je kod implantacije Ag/PVA/Gr gustina infiltracije makrofagima vezivnotkivne kapsule bila značajno manja u odnosu na infiltraciju kod aplikacije Suprasorba u 7, 15. i 30. postoperativnom danu, ista se na kraju perioda posmatranja nije razlikovala od gustine infiltracije kapsule koja je okruživala Suprasorb. Slični rezultati dobijeni su i u pogledu infiltracije perikapsularnog vezivnog tkiva prilikom aplikacije sva tri hidrogela, tokom perioda postoperativnog praćenja (sl. 5.68 do 5.71).

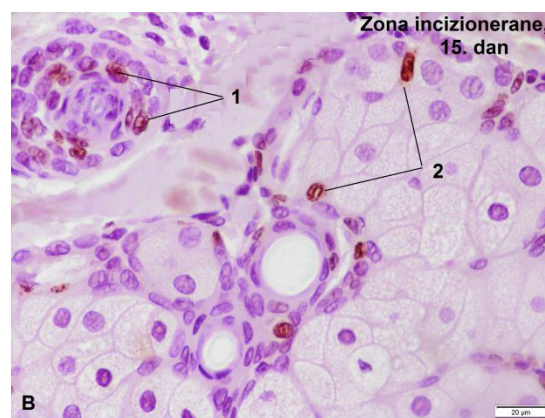
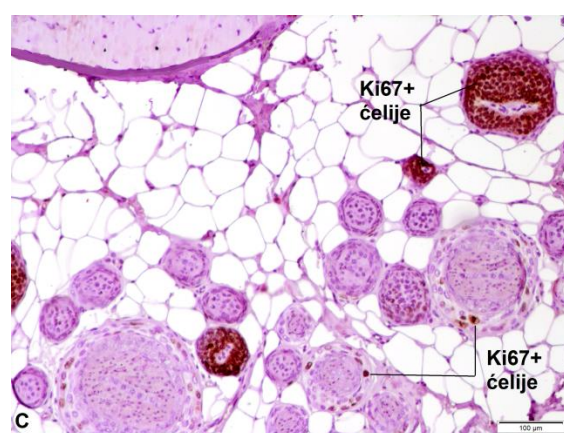
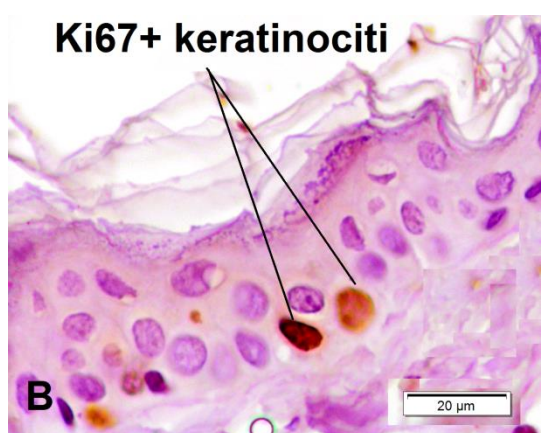
5.2.5. Indeks proliferacije keratinocita epidermisa i fibroblasta periimplantne zone kod supkutane aplikacije hidrogelova Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba

Broj Ki67⁺-ćelija na 100 bazalnih ćelija epidermisa iznad zone implantacije hidrogelova prikazan je na grafikonu 5.13, tabelama 5.33 i 5.34 i slikama 5.76-5.80.



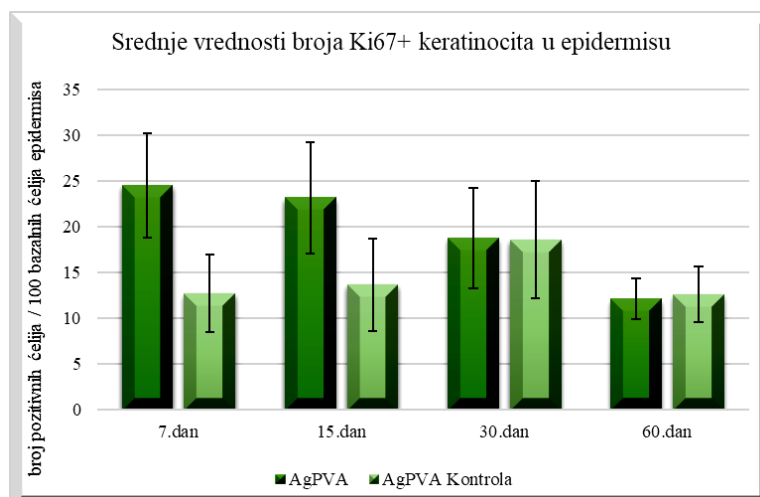
Slika 5.76. Keratinociti u proliferaciji (Ki67⁺) u kontrolnoj intaktnoj koži pacova. IHH bojenje na Ki67, A-bar:200μm; B-bar:20μm; C-bar:100μm.

Vide se Ki67⁺ keratinociti u bazalnom sloju epidermisa (A i B) i keratinocitima folikula dlake (C).

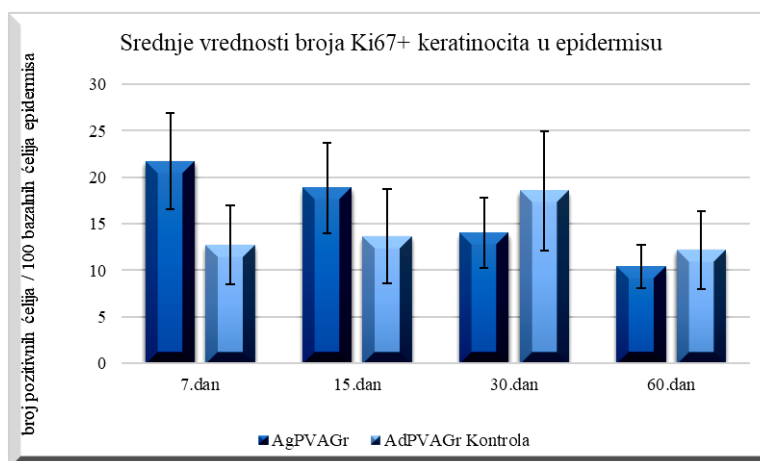


Slika 5.77. Keratinociti u proliferaciji u koži incizone rane, 15. dana nakon operacije. IHH bojenje na Ki67, bar:20μm. Vide se Ki67⁺ keratinociti bazalnog sloja epidermisa (A), kao i Ki67⁺ keratinociti u folikulima dlake (B, 1) i u lojnim žlezdama (B, 2).

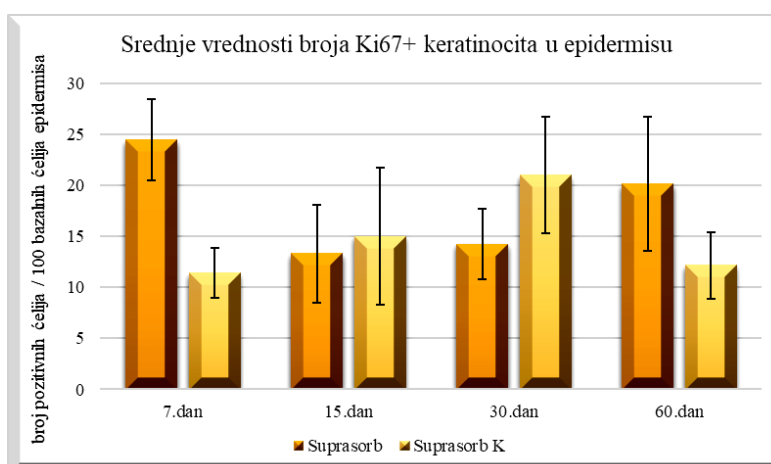
Indeks proliferacije keratinocita bazalnog sloja epidermisa u koži iznad zone implantacije, izražen kao broj Ki67⁺-keratinocita na 100 bazalnih ćelija epidermisa, pokazao je da je taj indeks bio najveći 7. postoperativnog dana, u slučaju aplikacije sva tri hidrogela (grafikoni 5.13 i 5.14).



Ag/PVA: kontrola, 7. dan, $t = 7,419, p < 0,001$; 15. dan, $t = 5,393, p < 0,001$



Ag/PVA/Gr: kontrola, 7. dan, $t = 6,030, p < 0,001$; 15. dan, $t = 3,311, p = 0,002$



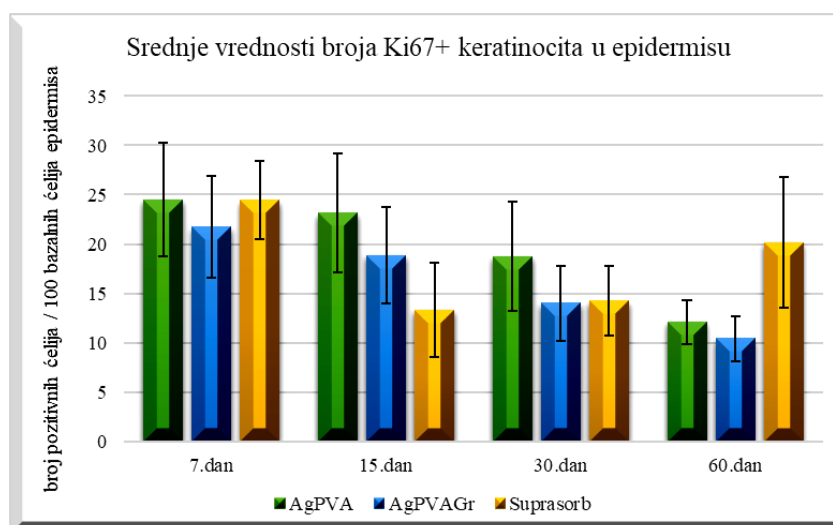
Ag/PVA/Gr: kontrola, 7. dan, $t = 12,476, p < 0,001$; 30. dan, $t = -4,177, p < 0,001$; 60. dan, $t = 4,461, p < 0,001$

Grafikon 5.13. Kretanje broja Ki67⁺-keratinocita bazalnog sloja epidermisa tokom postoperativnog perioda, nakon supkutane implantacije Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba.

Tabela 5.33. Statistički pokazatelji višestruke komparacije Bonferonijevim testom broja Ki67⁺ keratinocita bazalnog sloja epidermisa u koži iznad zone implantacije različitih hidrogelova, u zavisnosti od vremena posmatranja.

Dependent Variable	(I) Merenja	(J) Merenja	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Ag/PVA	7	15	1.350	1.617	1.000	-3.03	5.73
		30	5.750*	1.617	0.004	1.37	10.13
		60	12.400*	1.617	<0.001	8.02	16.78
	15	7	-1.350	1.617	1.000	-5.73	3.03
		30	4.400*	1.617	0.048	0.02	8.78
		60	11.050*	1.617	<0.001	6.67	15.43
	30	7	-5.750*	1.617	0.004	-10.13	-1.37
		15	-4.400*	1.617	0.048	-8.78	-0.02
		60	6.650*	1.617	0.001	2.27	11.03
	60	7	-12.400*	1.617	<0.001	-16.78	-8.02
		15	-11.050*	1.617	<0.001	-15.43	-6.67
		30	-6.650*	1.617	0.001	-11.03	-2.27
Ag/PVA - kontrola	7	15	-0.950	1.529	1.000	-5.09	3.19
		30	-5.850*	1.529	0.002	-9.99	-1.71
		60	0.100	1.529	1.000	-4.04	4.24
	15	7	0.950	1.529	1.000	-3.19	5.09
		30	-4.900*	1.529	0.012	-9.04	-0.76
		60	1.050	1.529	1.000	-3.09	5.19
	30	7	5.850*	1.529	0.002	1.71	9.99
		15	4.900*	1.529	0.012	0.76	9.04
		60	5.950*	1.529	0.001	1.81	10.09
	60	7	-0.100	1.529	1.000	-4.24	4.04
		15	-1.050	1.529	1.000	-5.19	3.09
		30	-5.950*	1.529	0.001	-10.09	-1.81
Ag/PVA/Gr	7	15	2.850	1.325	0.208	-0.74	6.44
		30	7.700*	1.325	<0.001	4.11	11.29
		60	11.300*	1.325	<0.001	7.71	14.89
	15	7	-2.850	1.325	0.208	-6.44	0.74
		30	4.850*	1.325	0.003	1.26	8.44
		60	8.450*	1.325	<0.001	4.86	12.04
	30	7	-7.700*	1.325	<0.001	-11.29	-4.11
		15	-4.850*	1.325	0.003	-8.44	-1.26
		60	3.600*	1.325	0.049	0.01	7.19

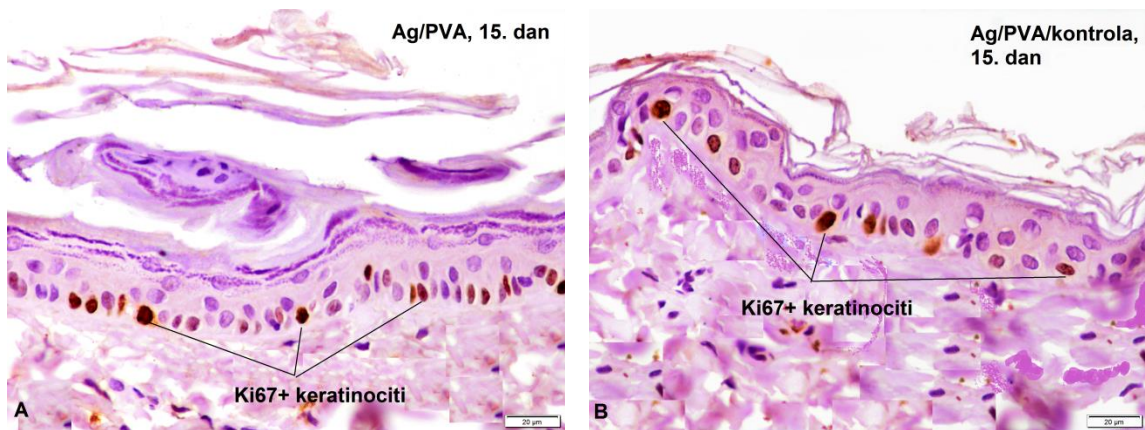
	60	7	-11.300*	1.325	<0.001	-14.89	-7.71
		15	-8.450*	1.325	<0.001	-12.04	-4.86
		30	-3.600*	1.325	0.049	-7.19	-0.01
Ag/PVA/Gr – kontrola	7	15	-0.950	1.596	1.000	-5.27	3.37
		30	-5.850*	1.596	0.003	-10.17	-1.53
		60	0.500	1.596	1.000	-3.82	4.82
	15	7	0.950	1.596	1.000	-3.37	5.27
		30	-4.900*	1.596	0.018	-9.22	-0.58
		60	1.450	1.596	1.000	-2.87	5.77
	30	7	5.850*	1.596	0.003	1.53	10.17
		15	4.900*	1.596	0.018	0.58	9.22
		60	6.350*	1.596	0.001	2.03	10.67
	60	7	-0.500	1.596	1.000	-4.82	3.82
		15	-1.450	1.596	1.000	-5.77	2.87
		30	-6.350*	1.596	0.001	-10.67	-2.03
Suprasorb	7	15	11.150*	1.539	<0.001	6.98	15.32
		30	10.200*	1.539	<0.001	6.03	14.37
		60	4.300*	1.539	0.039	0.13	8.47
	15	7	-11.150*	1.539	<0.001	-15.32	-6.98
		30	-0.950	1.539	1.000	-5.12	3.22
		60	-6.850*	1.539	<0.001	-11.02	-2.68
	30	7	-10.200*	1.539	<0.001	-14.37	-6.03
		15	0.950	1.539	1.000	-3.22	5.12
		60	-5.900*	1.539	0.002	-10.07	-1.73
	60	7	-4.300*	1.539	0.039	-8.47	-0.13
		15	6.850*	1.539	<0.001	2.68	11.02
		30	5.900*	1.539	0.002	1.73	10.07
Suprasorb - kontrola	7	15	-3.150	1.538	0.264	-7.32	1.02
		30	-9.100*	1.538	<0.001	-13.27	-4.93
		60	-1.400	1.538	1.000	-5.57	2.77
	15	7	3.150	1.538	0.264	-1.02	7.32
		30	-5.950*	1.538	0.001	-10.12	-1.78
		60	1.750	1.538	1.000	-2.42	5.92
	30	7	9.100*	1.538	<0.001	4.93	13.27
		15	5.950*	1.538	0.001	1.78	10.12
		60	7.700*	1.538	<0.001	3.53	11.87
	60	7	1.400	1.538	1.000	-2.77	5.57
		15	-1.750	1.538	1.000	-5.92	2.42
		30	-7.700*	1.538	<0.001	-11.87	-3.53



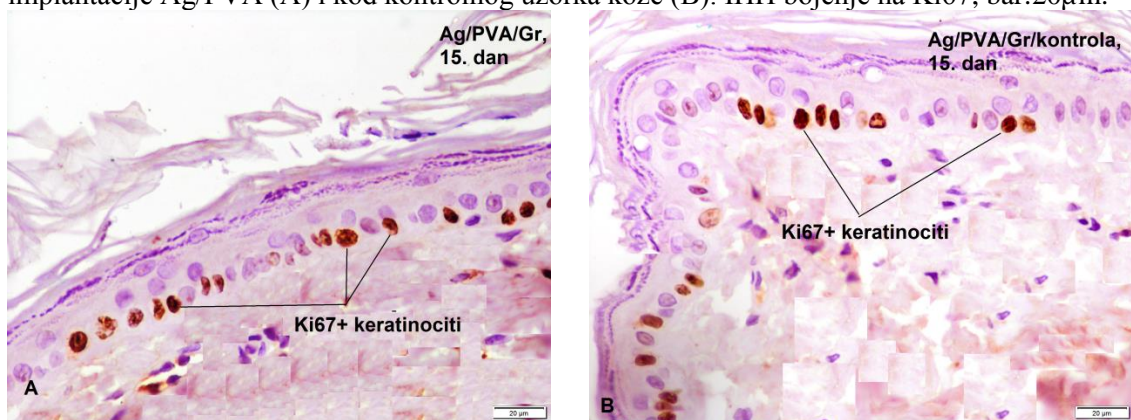
Grafikon 5.14. Broj Ki67⁺-keratinocita bazalnog sloja epidermisa kod aplikacije Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suoprasorba u svakom od perioda praćenja.

Tabela 5.34. Statistički pokazatelji višestruke komparacije Bonferonijevim testom broja Ki67⁺-keratinocita bazalnog sloja epidermisa u zoni implantacije različitih hidrogelova, u okviru svakog od posmatranih perioda (prikazanih na grafikonu 5.13).

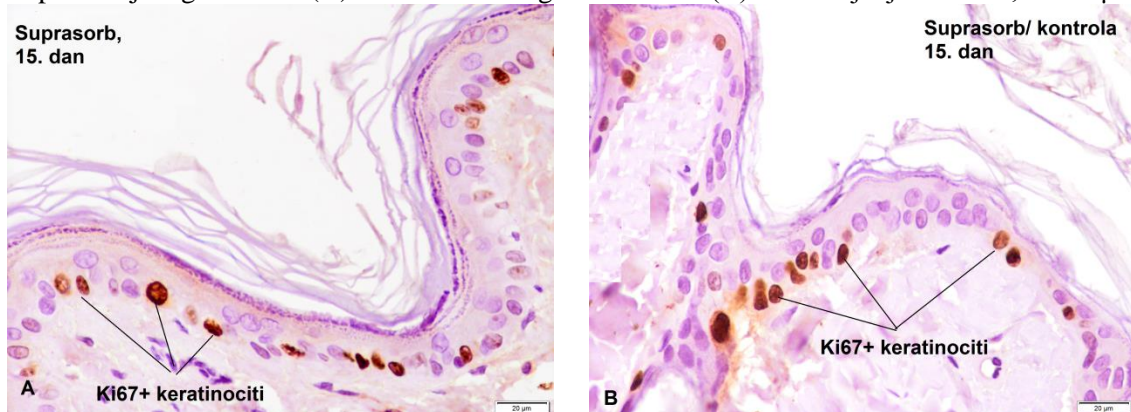
Dependent Variable	(I) Podloge	(J) Podloge	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
7 dan	1 (Ag/PVA)	2	2.800	1.584	0.247
		3	0.050	1.584	1.000
	2 (Ag/PVA/Gr)	1	-2.800	1.584	0.247
		3	-2.750	1.584	0.264
	3 (Suprasorb)	1	-0.050	1.584	1.000
		2	2.750	1.584	0.264
15 dan	1 (Ag/PVA)	2	4.300*	1.669	0.038
		3	9.850*	1.669	<0.001
	2 (Ag/PVA/Gr)	1	-4.300*	1.669	0.038
		3	5.550*	1.669	0.005
	3 (Suprasorb)	1	-9.850*	1.669	<0.001
		2	-5.550*	1.669	0.005
30 dan	1 (Ag/PVA)	2	4.750*	1.375	0.003
		3	4.500*	1.375	0.005
	2 (Ag/PVA/Gr)	1	-4.750*	1.375	0.003
		3	-0.250	1.375	1.000
	3 (Suprasorb)	1	-4.500*	1.375	0.005
		2	0.250	1.375	1.000
60 dan	1 (Ag/PVA)	2	1.700	1.341	0.630
		3	-8.050*	1.341	<0.001
	2 (Ag/PVA/Gr)	1	-1.700	1.341	0.630
		3	-9.750*	1.341	<0.001
	3 (Suprasorb)	1	8.050*	1.341	<0.001
		2	9.750*	1.341	<0.001



Slika 5.78. Keratinociti u proliferaciji (Ki67⁺) bazalnog sloja epidermisa kože iznad zone implantacije Ag/PVA (A) i kod kontrolnog uzorka kože (B). IHH bojenje na Ki67, bar:20µm.



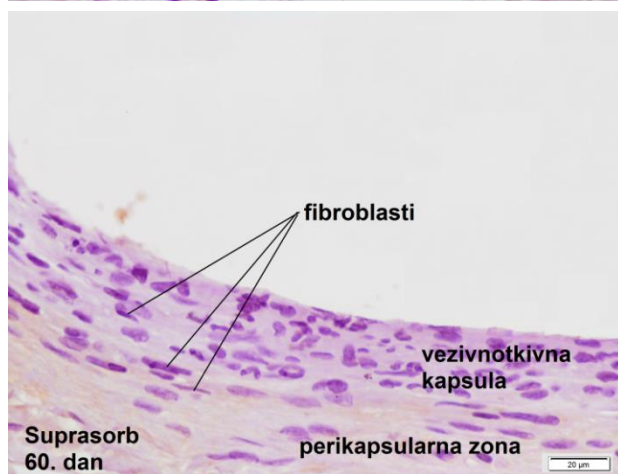
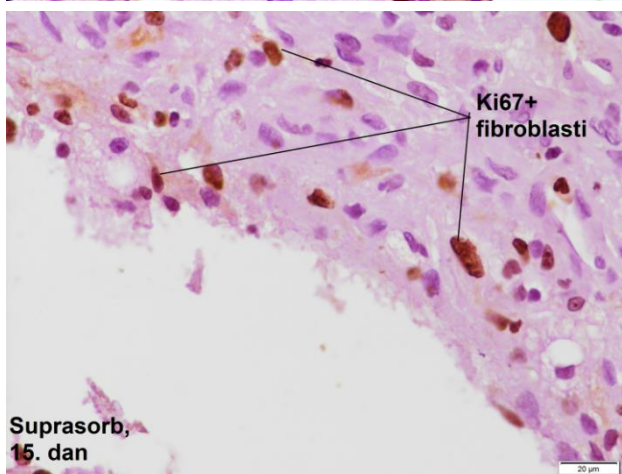
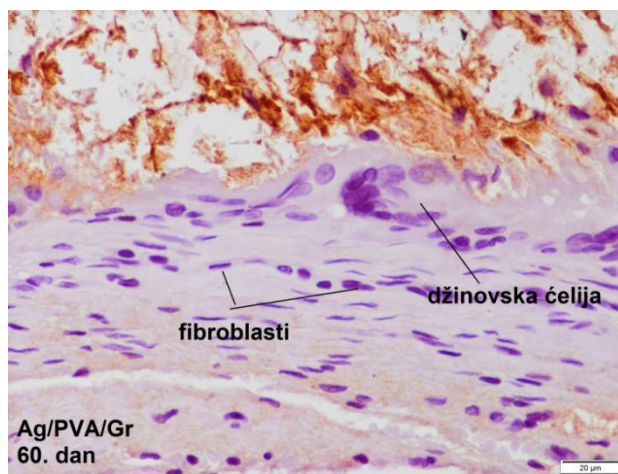
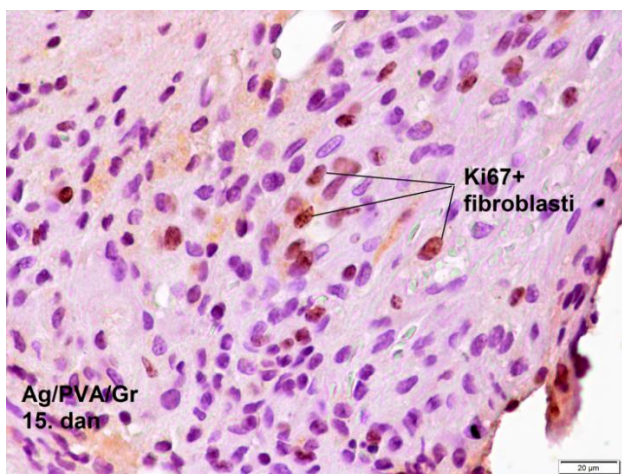
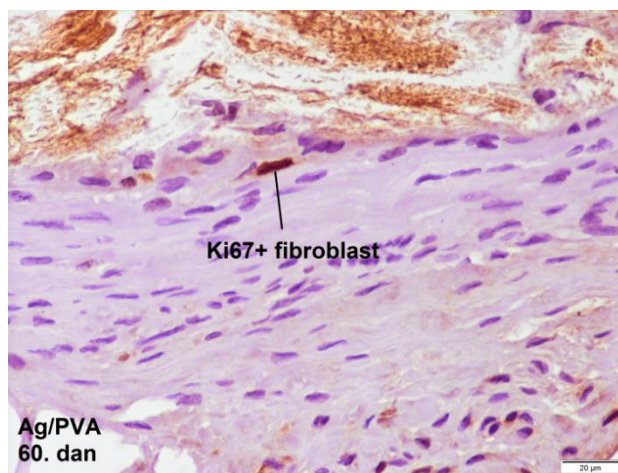
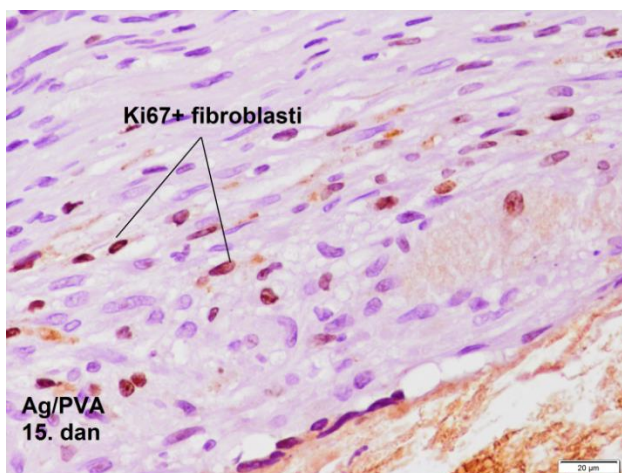
Slika 5.79. Keratinociti u proliferaciji (Ki67⁺) bazalnog sloja epidermisa kože iznad zone implantacije Ag/PVA/Gr (A) i kod kontrolnog uzorka kože (B). IHH bojenje na Ki67, bar:20µm



Slika 5.80. Keratinociti u proliferaciji (Ki67⁺) bazalnog sloja epidermisa kože iznad zone implantacije Suprasorba (A) i kod kontrolnog uzorka kože (B). IHH bojenje na Ki67, bar:20µm.

U slučaju aplikacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr došlo je do značajnog smanjenja broja Ki67⁺-keratinocita bazalnog sloja epidermisa 30. i 60. postoperativnog dana u odnosu na veoma slične visoke vrednosti zabeležene u 7. i 15. danu (sl. 5.78- 5.80). U slučaju implantacije Suprasorba, početne visoke vrednosti broja keratinocita epidermisa

u proliferaciji smanjile su se na slične vrednosti 15. i 30. postoperativnog dana, a potom je proliferacija ponovo bila stimulisana u 60. postoperativnom danu (grafikon 5.13).



Slike 5.81, 5.82 i 5.83. Fibroblasti vezivnotkivne kapsule u proliferaciji 15. dana nakon aplikacije Ag/PVA (gore), Ag/PVA/Gr (u sredini) i Suprasorba (dole). IHH bojenje na Ki67, bar:20µm.

Slike 5.84, 5.85 i 5.86. Fibroblasti vezivnotkivne kapsule u proliferaciji 60. dana nakon aplikacije Ag/PVA (gore), Ag/PVA/Gr (u sredini) i Suprasorba (dole). IHH bojenje na Ki67, bar:20µm.

Kada se materijali uporede međusobno u različitim periodima posmatranja, zapaža se da je u 15. i 30. postoperativnom danu veći proliferativni indeks bio kod aplikacije Ag/PVA u odnosu na Ag/PVA/Gr, ali su vrednosti bile međusobno vrlo slične u 7. i 60. postoperativnom danu između navedenih hidrogelova. Takođe, u poslednjem terminu posmatranja, indeks proliferacije keratinocita kod Ag/PVA i Ag/PVA/Gr bio je značajno manji od indeksa proliferacije koji je dobijen prilikom aplikacije Suprasorba (grafikon 5.14).

Tabela 5.35. Fibroblasti u proliferaciji (Ki67⁺) u vezivnotkivnoj kapsuli i perikapsularnom supkutanom vezivnom tkivu kod aplikacije Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba.

Eksperimentalne grupe	Ki67 ⁺ -fibroblasti / 1000 fibroblasta			
	7. dan*	15. dan	30. dan	60. dan
Ag/PVA				
kapsula	0,159±0,0122	0,297±0,1301	0,262±0,0874	0,000±0,0000
perikapsularna zona	0,079±0,0011	0,012±0,0053	0,010±0,00300	0,000±0,0000
Ag/PVA/Gr				
kapsula	0,148±0,009	0,2901±0,1292	0,153±0,0131	0,000±0,0000
perikapsularna zona	0,007±0,0001	0,0145±0,0065	0,0061±0,0065	0,000±0,0000*
Suprasorb				
kapsula	0,156±0,0231	0,320±0,0843	0,2993±0,1302	0,000±0,0000
perikapsularna zona	0,010±0,0015	0,021±0,0056	0,0149±0,0065	0,000±0,0000

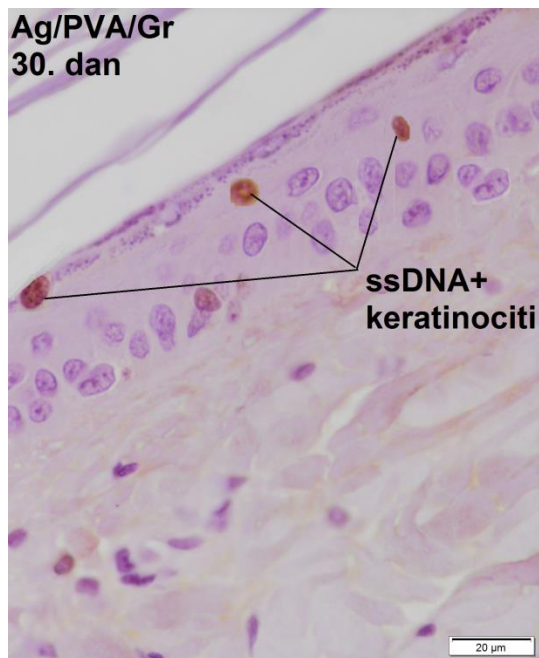
*Ag/PVA: 60. dan: 7,15. i 30. danu, p<0,001; 15. i 30. dan: 7. danu, p<0,001; Ag/PVA/Gr: 60. dan: 7, 15. i 30. danu, p<0,001; 15. dan: 7. danu i 30. danu, p<0,001; Suprasorb: 60. dan: 7, 15. i 30. danu, p<0,001; 15. i 30. dan: 7. danu, p<0,001.

Proliferacija fibroblasta zapažena je u slučaju aplikacije sva tri hidrogela u 7, 15 i 30. postoperativnom danu, dok u 60. danu nisu registrovani fibroblasti u proliferaciji, tj. njihov broj bio je zanemarljiv. Broj fibroblasta u proliferaciji bio je najveći u 15. i 30. postoperativnom danu u slučaju aplikacije Ag/PVA i Suprasorba, tj. u 15. postoperativnom danu u slučaju aplikacije Ag/PVA/Gr (tabela 5.35 i sl. 5.81-5.86).

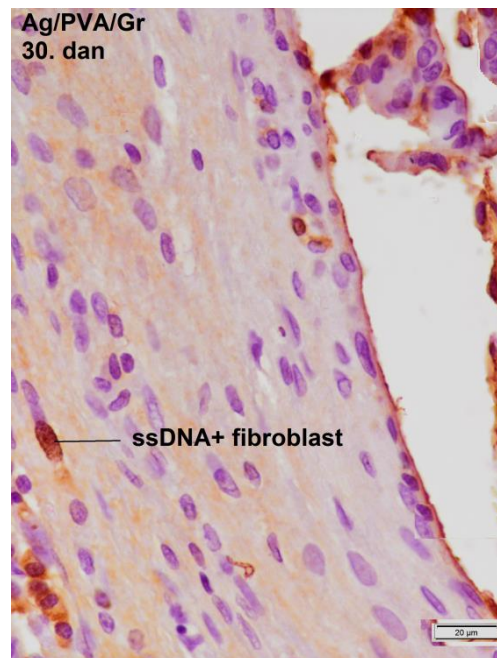
5.2.6. Apoptoza u epitelnim ćelijama epidermisa kože i fibroblastima periimplantne zone kod supkutane aplikacije Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba

Apoptoza keratinocita u epidermisu iznad implantacione zone (tabela 5.36) bila je najveća 7. dana praćenja, u slučaju aplikacije sva tri hidrogela. U slučaju aplikacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr (sl. 5.87) došlo je do značajnog smanjenja apoptoze keratinocita 30. i 60. postoperativnog dana, za razliku od implantacije Suprasorba, kod koga je, pored 7. dana, najviše ssDNA⁺-ćelija registrovano i u 60. danu nakon operacije. U 15. i 30. postoperativnom danu registrovan je veći broj keratinocita u apoptozi kod

aplikacije Ag/PVA u odnosu na aplikaciju Ag/PVA/Gr. Takođe, u poslednjem terminu posmatranja, broj keratinocita u apoptozi kod ova dva hidrogela bio je značajno manji od indeksa apoptoze koji je izmeren u slučaju aplikacije Suprasorba.



Slika 5.87. Keratinociti u apoptozi u epidermisu kože iznad implantiranog Ag/PVA/Gr, 30. postoperativnog dana. IHH bojenje na ssDNA, bar:20μm.



Slika 5.88. Fibroblast u apoptozi u vezivnoj kapsuli 30. dana nakon implantacije Ag/PVA/Gr. IHH bojenje na ssDNA, bar:20μm.

Tabela 5.36. Keratinociti u apoptozi (ssDNA⁺) u epidermisu kože iznad implantiranih Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba

Eksperimentalne grupe	ssDNA ⁺ -keratinociti u epidermisu (broj/100 keratinocita)			
	7. dan	15. dan*	30. dan	60. dan
Ag/PVA	20,50±5,175	20,00±6,055	16,32±5,483	11,98±2,235
Ag/PVA/Gr	19,70±5,062	16,73±4,893	12,45±3,787	10,32±2,301
Suprasorb	23,35 ± 3,773	13,07±4,790	14,11±3,429	20,12±6,703

*15. dan: Ag/PVA: Ag/PVA/Gr, p=0,038; Ag/PVA i Ag/PVA/Gr: Suprasorb, p=0,005; 30. dan: Ag/PVA: Ag/PVA/Gr, p=0,003; Ag/PVA/Gr: Suprasorb, p<0,05; 60. dan: Ag/PVA i Ag/PVA/Gr: Suprasorb, p<0,001.

Apoptoza fibroblasta u kapsuli i perikapsularnoj zoni (tabela 5.37), bila je veoma slična trendu zapaženom u pogledu proliferacije fibroblasta, kako u pogledu vremena posmatranja, tako i u odnosu na vrstu aplikovanih hidrogelova. Ona je bila najveća u 15. i 30. postoperativnom danu u slučaju aplikacije Ag/PVA i Suprasorba, tj. u 15. postoperativnom danu u slučaju aplikacije Ag/PVA/Gr (sl. 5.88-5.90). Na kraju perioda posmatranja broj apoptotskih fibroblasta bio je zanemarljiv, osim u slučaju aplikacije Suprasorba, gde se pored apoptoze fibroblasta zapažala i apoptoza makrofaga.



Slika 5.89. Fibroblasti u apoptozi (ssDNA⁺) u kapsuli oko implan-tiranog Suprasorba, 60. dana nakon operacije.

IHH bojenje na ssDNA, bar:20µm.



Slika 5.90. Makrofagi u apoptozi (ssDNA⁺) u kapsuli oko implan-tiranog Suprasorba, 60. dana nakon operacije.

IHH bojenje na ssDNA, bar:20µm.

Tabela 5.37. Fibroblasti u apoptozi (ssDNA⁺) u vezivnotkivnoj kapsuli i perikapsularnom supkutanom vezivnom tkivu kod aplikacije Ag/PVA, Ag/PVA/Gr i Suprasorba

Eksperimentalne grupe	ssDNA ⁺ -fibroblasti (broj/1000 fibroblasta)				
	7. dan	15. dan*	30. dan	60. dan	
Ag/PVA	kapsula	0,139±0,0112	0,237±0,1202	0,232±0,0844	0,000±0,0000
	perikapsularna zona	0,067±0,0010	0,010±0,0050	0,010±0,0028	0,000±0,0000
Ag/PVA/Gr	kapsula	0,143±0,009	0,290±0,1292	0,151±0,0130	0,000±0,000
	perikapsularna zona	0,007±0,001	0,015±0,0067	0,0058±0,0055	0,000±0,0000
Suprasorb	kapsula	0,151±0,0330	0,320±0,0843	0,2993±0,1302	0,100±0,0003
	perikapsularna zona	0,009±0,0075	0,021±0,0056	0,0100±0,0005	0,000±0,00000

*Kapsula i perikapsularna zona: 15. dan: Ag/PVA: Ag/PVA/Gr, p=0,030; Ag/PVA i Ag/PVA/Gr: Suprasorb, p=0,005; 30. dan: Ag/PVA: Ag/PVA/Gr, p=0,003; Ag/PVA/Gr: Suprasorb, p<0,05; 60. dan (kapsula): Ag/PVA i Ag/PVA/Gr: Suprasorb, p<0,001.

6. DISKUSIJA

Istraživanja prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji zasnovana su na proceni biokompatibilnosti novosintetisanog hidrogela PVA/Gr sa inkorporiranim AgNPs, da bi se ispitalo da li inkorporisani grafen utiče na biokompatibilnost polimernog hidrogela Ag/PVA. Iako do sada postoje studije o Ag/PVA/Gr polimerima [*Wang i sar., 2011; Xue i sar., 2015; Abudabbus i sar., 2016; Surudžić i sar., 2016; Usman i sar., 2016; Abudabus i sar., 2018*], ni jedna od njih ne pruža informacije o njihovoj biokompatibilnosti *in vivo*. Iz tog razloga *in vivo* istraživanje novih Ag/PVA/Gr hidrogelova sa poboljšanim fizičkim svojstvima predstavlja osnovu za buduća preklinička i klinička istraživanja u cilju korišćenja tih gelova u humanoj i veterinarskoj medicini.

Jednostavna struktura i specifična svojstva PVA polimera, kao što su adhezija, čvrstoća, formiranje filma, hidrofilitnost i vrlo mali kapacitet bubrenja (s obzirom na njihovu osetljivost na vezivanje vodonika i prekomernu kristalizaciju), zatim biokompatibilnost i nekancerogena svojstva, čine ih veoma poželjnim za specifične primene u biomedicini [*Muppalaneni i Omidian, 2013*]. Kao što je već istaknuto u poglavlju Pregled literature, danas se u biomedicini PVA hidrogelovi upotrebljavaju kao meki materijali za izgradnju kontaktnih sočiva, veštačke rožnjače, veštačkih hrskavica i meniskusa, za regeneraciju tetiva i koštanog tkiva, kao hidrogelna površina na glavi humerusa u ramenom zglobu, zatim za smanjenje formiranja adhezija kod peritonitisa, kao nosači za lekove, kao supstrat za ćelijski rast, u brahiterapiji prostate, za kardiovaskularne graftove itd. Sa velikim optimizmom treba sagledati uspešne rezultate prvih kliničkih studija sa dugoročnim praćenjem (5-8 godina) komercijalnog PVA implantata (*Cortiva, RTI Surgical Inc., FL, SAD*) u saniranju defekta fokalne hrskavice. Rezultati ove studije pokazuju da upotreba sintetičkog PVA hidrogela garantuje funkcionalni oporavak kolennog zgloba pacijenata srednje dobi sa dijagnostikovanim fokalnim lezijama hrskavice [*Scaretta, 2013*]. Objavljeni su i preliminarni rezultati kliničke studije o regeneraciji metakarpalne kosti nakon implantacije PVA hidrogela kod pacijenata sa osteoartritisom [*Taleb, 2014*]. Takođe su objavljene i odlični klinički rezultati nakon 5 godina od sprovedene, sa PVA hidrogelom, hemiartroplastike prvog metatarzofalangealnog zgloba kod uznapredovalog *hallux rigidus* [*Daniels, 2017*]. Međutim, fizička svojstva **PVA hidrogelova** su uglavnom reverzibilna i to dovodi do

narušavanja njihove stabilnosti. Viskoznost, stepen kristalizacije i pH senzitivnost PVA hidrogelova se menjaju tokom vremena, što dovodi do slabljenja mehaničkih svojstava. U poređenju sa drugim hidrogelovima PVA hidrogelovi izazivaju slabiju ćelijsku adheziju usled slabije apsorpcije proteina, što ih, po mišljenju pojedinih autora, čini manje efektivnim u tretmanu defekata hrskavice putem autologne transplantacije hondrocita povezanih sa matriksom [Baker i sar., 2012]. Zbog toga se danas sintetišu PVA kopolimeri sa titanijumskim vlaknima [Kobayashi i Oka, 2004], nanohidroksiapatitom [Wu i sar., 2007], želatinom [Pal sar., 2007], poliakrilnom kiselinom [Mc Gann i sar., 2009], alginatom [Bichara i sar., 2010], svilenim fibroinom [Kundu i sar., 2012], ekstraktom rogača [Kaity i sar., 2013], hidroksietilskrobom [Kenawy i sar., 2014], polietilenglikolom [Gadea i sar., 2013], nanočesticama hijaluronana i srebra [Zhang i sar., 2013], grafenom [Pinto i sar., 2016], celulozom [Gonzalez i sar., 2014] i celulozom sa grafenom [Xue i sar., 2015]. Očekuju se dalja preklinička istraživanja kada je u pitanju novi kopolimerni hidrogel PVA (50%) sa svilenim fibroinom (50%), s obzirom da se njegova upotreba u tkivnom inženjerstvu aurikularne hrskavice pokazala veoma uspešnom [Lee i sar., 2017]. Danas, u eri velikog naučnog interesovanja za matične ćelije i ćelijsku regenerativnu terapiju, važno je istaći da su se sam PVA [Kim i sar., 2015], kao i kopolimeri PVA sa drugim materijalima, pokazali kao odlični nosači za MSCs. Tako je hidrogel od PVA i dekstrana, na koji su posađene MSCs u vidu malog vaskularnog grafta, uspešno primenjen u prekliničkoj studiji na ovcama [Alexandre i sar., 2014], a kao potencijalni nosači za ove ćelije, radi moguće primene u lečenju fokalnih defekata hrskavice, ispitivani su i kopolimeri PVA/hitozan i PVA/alginat [Dashtdar i sar., 2015], i svi su pokazali dobru biokompatibilnost.

U cilju traganja za **idealnim oblogama za rane**, razvijeni su mnogi novi materijali na bazi kompozitnih polimera sa nanopartikulama i okarakterisane su njihove fizičke i hemijske osobine, međutim dostupni preklinički podaci o takvim oblogama za rane kod ljudi i životinja, trenutno su retki. Uvođenje nanočestica u polimerne/kopolimerne hidrogelove povećava mehaničku i toplotnu stabilnost sa kapacitetom bubrenja i prenosom vodene pare nastalih membrana, posebno u području stresa [Kamoun i sar., 2017]. Poznato je da se obloge za rane klasifikuju kao: 1) *tradicionalne* (gaza ili kompozit gaza/vuna/pamuk); 2) *biološke* (auto- i

heterotransplantati sa čoveka, životinje ili kadavera) i 3) *veštačke/sintetičke* (njihove komponente ne izgrađuju kožu). Među veštačkim oblogama za rane nalaze se i polimeri, tj. polimerni hidrogelovi, uključujući i one izrađene na bazi PVA. Danas su na raspolaganju mnogobrojne komercijalne obloge za rane na bazi veštačkih materijala. Među njima se izdvajaju polimerni filmovi, polimerne pene, polimerni hidrogelovi, polimerni alginati i polimerni hidroceluloidi. Polimerni filmovi sintetišu se uglavnom od poliuretana. Polimerne pene sintetišu se od hidrofilnih pena i hidrofobne ili semipermeabilne podloge sa neadsorbentnom membranom (npr. poliksietilen-glikol obložen poliuretanom ili silikonskim poliestrom). Obloge od polimernih alginata nastaju hemijskim unakrsnim vezivanjem Na-alginata u rastvoru Ca, Mg ili Zn. Polimerni hidrokoloidi kao obloge za rane sintetišu se imobilizacijom joda na modifikovanom skrobu baziranom na kadeksomer-jodnim perlama. Polimerni hidrogelovi kao komercijalne obloge za rane sintetišu se unakrsnim povezivanjem hidrofilnih polimera, kao što su PVA, polivinil-pirolidon (PVP) ili polietilen-oksidi [Kamoun i sar., 2017].

Obloge za rane na bazi polimernih hidrogelova koriste se najčešće kao hemoterapeutske perle, za lečenje ulcera, lasersku reepitelizaciju, debele rane, tretiranje mesta sa koga je uzet graft, kao i za tretiranje artificijelnih organskih rana. Pokazano je da je postotak rana koje su zarasle uz pomoć obloga za rane od hidrogelova bio znatno veći (85%), u odnosu na procenat rana koje su zarastale uz pomoć tradicionalnih obloga od gaze (50%). Ove polimerne obloge za rane na bazi hidrogelova ubrzavaju i zarastanje dekubitusnih rana podstičući njihovu bržu epitelizaciju [Sood i sar., 2014].

PVA je jedan od najčešće korišćenih i najstarijih sintetičkih polimera kada su u pitanju **obloge za rane**. Međutim, PVA hidrogelovi poseduju neadekvatnu elastičnost, krutu membranu, relativno slabu barijeru pri penetraciji bakterija, ponekad pokazuju slabu mehaničku stabilnost i nekompletne hidrofilne karakteristike, što donekle ograničava njihovu upotrebu kao jedine polimerne membrane pri obradi rana. Pored različitih hidrogelova koji se opisuju u literaturi, hidrogelovi bazirani na **kopolimeru PVA** sa nekim prirodnim ili sintetičkim polisaharidima, kao što su nanočestice srebra (AgNPs/PVA) [Loo i sar., 2014; Oliviera i sar., 2014], hitozan-oligosaharid i AgNPs (AgNPs/PVA/hitozan) [Li i sar., 2013; Abdelgawad i sar., 2014], hijaluronan i AgNPs (HA/PVA/AgNPs) [Zhang i sar., 2013], celuloza [Gonzales i sar., 2014], pokazali su se kao najatraktivniji način sinteze membrana i obloga za rane, pre svega zbog

rasprostranjenosti ovih polimera, a zatim i zbog njihovog lakog hemijskog izdvajanja ili modifikacije i obično dobre biokompatibilnosti [*Oliviera i sar., 2014; Kamoun i sar., 2017*]. U literaturi su deficitarni podaci o njihovoj biokompatibilnosti *in vivo*, pa su potrebna detaljna ispitivanja biokompatibilnosti ovih nanomaterijala na eksperimentalnim životinjama, kao jedan od najvažnijih preduslova za širu kliničku primenu.

Uvođenjem nanočestica srebra u polimerne/kopolimerne hidrogelove povećava se njihova antimikrobna aktivnost, dok se inkorporacijom grafena postiže poboljšanje mehaničkih svojstava. Međutim, ovi materijali nisu biorazgradivi, tako da se njihova upotreba preporučuje samo u tretmanima površinskih rana ili se koriste kao mekotkivni implantati. Potvrđeno je da, u odnosu na sve druge metale sa antimikrobnim svojstvima, srebro ima najefikasniju antibakterijsku aktivnost i nisku citotoksičnost. Antimikrobna svojstva AgNPs povezana su sa: 1) sposobnošću da snažno reaguju sa tiolnom grupom jedinjenja koja se nalaze u respiratornim enzimima bakterijskih ćelija; 2) nekuplovanjem oksidativne fosforilacije u bakterijskoj ćeliji; 3) indukcijom ćelijske smrti bakterije putem indukcije oslobađanja slobodnih kiseoničnih radikala; 4) interferencijom sa respiratornim lancem na nivou citohroma C i komponentama transportnog sistema elektrona u bakterijskoj ćeliji; 5) interakcijom sa sulfuronskim grupama u membranama bakterija, čime se oštećuje bakterijski omotač; 6) interakcijom sa fosfornim grupama u DNK, čime se oštećuje hromozomski materijal jedra. Kao rezultat toga AgNPs su efikasna antiseptička sredstva za kontrolu mikroorganizama širokog spektra i bakterija otpornih na antibiotike, pa se njihovom upotrebom značajno smanjuje mogućnost bakterijske rezistencije na antibiotike [*Korbekandi i Iravani, 2012*]. Međutim, ne treba zaboraviti i na potencijalna toksična dejstva AgNPs na cirkulatorni, respiratorni, centralni nervni sistem, jetru i kožu [*Stensbergisar., 2011*]. Kao ni druge nanopartikule koje mogu da se inkorporišu u obloge za rane (npr. ZnO, ZnO₂, TiO₂, GO, hidroksiapatit i sl.), nanočestice srebra ne podležu biodegradaciji pa je preporučeno da se upotrebljavaju samo kod površinskih i plitkih rana [*Kamoun i sar., 2017*].

U današnje vreme je zapažen trend smanjenja korišćenja antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicini, kao i u proizvodnji mesa. Studije kojima su proučavana svojstva i mogućnosti **hibridnog materijala AgNPs/PVA** [*Moretto, 2004; Pencheva, 2012*],

pružaju uvid u niz pogodnosti korišćenja PVA sa dodatkom eksperimentalne kremaste formule srebra za topikalnu terapijsku primenu, čime se postiže potpuni oporavak životinje, uz održavanje mikrobne homeostaze. Dobra antibakterijska svojstva pokazale su i kompozitne membrane od PVA/hitozan/ZnO i nanovlakna od PVA/alginata/ZnO, kao i nanokompozitne membrane od PVA i gline montmorilonita (PVA/MMT) [Kamoun i sar., 2017]. Kompozitna nanovlakna od AgNPs/PVA/hitozana imaju antibakterijska svojstva (inhibiraju rast *Escherichia coli*) i ubrzavaju zarastanje rane bolje nego obloge od gaze, pa se preporučuju kao bioaktivne obloge za rane [Li i sar., 2013].

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je novosintetisani i prethodno dobro okarakterisan polimer od AgNPs/PVA [Surundžić i sar., 2013], za koga je, u našim *in vivo* eksperimentima, pokazana odlična biokompatibilnost. Na osnovu minimalnog iritacionog indeksa, tanke vezivnotkivne kapsule formirane oko implantata bez značajno umnoženih kolagenih vlakana, veoma slabe inflamacije, dobre vaskularizacije periimplantne zone i prisustva makrofaga u njoj, zaključili smo da se ovaj materijal, nakon supkutane aplikacije kod pacova praćene tokom 60 dana trajanja eksperimenta, integriše u tkivo po principu vaskularne, nefibrotične integracije, pa je kompatibilan sa živim organizmima, odnosno biokompatibilan. To je u skladu sa radovima koji su pokazali biokompatibilnost *in vitro* samog polimera PVA [Wu i sar., 2007; Batista i sar., 2012; Hayes i sar., 2016], kao i sa malobrojnim radovima kojima su, u *in vivo* i *in vitro* uslovima, pokazali dobra biokompatibilna svojstva AgNPs/PVA kompozitnih materijala [Loo i sar., 2014; Oliviera i sar., 2014]. Wu i saradnici su potvrdili, kod eksperimentalnih životinja nakon intramuskularne aplikacije, da su porozni PVA, kao i PVA/hitozan i PVA/nanokompozitni hidroksiapatit (nHAP), elastični, hidrofilni i biokompatibilni (na osnovu primene MTT testa), kao i da se iz tih razloga mogu upotrebiti u tkivnom inženjerstvu kao dugotrajni permanentni skafoldi. Pored toga, među ispitivanim hidrogelovima PVA je pokazao najbolju snagu istezanja (0,60 Mpa).[Wu i sar., 2007]. Takođe je pokazano da se osteohondralni defekt na kolenu pacova može odlično sanirati upotrebom ozračenog i acetalizovanog PVA, s obzirom da je histološka analiza tkiva pokazala diferencijaciju i formiranje novog hrskavičnog tkiva na površini implantat / zona defekta, bez postojanja reakcije tipa oko stranog tela [Batista i sar., 2012]. Dokazana je i dobra biokompatibilnost PVA hidrogela i

netoksičnost prema L929 fibroblastnoj ćelijskoj liniji, namenjenog zameni i regeneraciji oštećenog meniskusa kolena [Hayes i sar., 2016]. Što se tiče kompozitnih hidrogelova AgNPs/PVA, Loo i sar. su pokazali da su hidrogelovi od PVA u koje su inkorporisane AgNPs, stabilni i pogodni za izradu endotrahealnih tubusa. Poznato je da je endotrahealna intubacija povezana sa čestim intrahospitalnim infekcijama, kao i da je intubacija odličan rezervoar za bakterijsku kolonizaciju pluća, što dodatno otežava izlečenje teških pacijenata sa intubacijom. Inkorporacija AgNPs u PVA povećala je snagu istezanja ovog polimera, kao i njegovu dužinu na pucanje. Pokazano je da AgNPs interreaguju samo sa ON-grupama u PVA u ovom kompozitnom materijalu, kao i da kompozit sprečava kolonizaciju *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* i ne pokazuje toksičnost prema humanim bronhijalnim epitelnim ćelijama [Loo i sar., 2014]. Oliviera i sar. su, na osnovu svojih istraživanja antimikrobne aktivnosti i biokompatibilnosti AgNPs/PVA dobijenih gama-zračenjem, preporučili ovaj hidrogel kao oblogu za rane prilikom lečenja opekotina. Kao agens prekursor nanočestica srebra korišćen je AgNO₃. Fiziološki rastvor i rastvori fosfatnog pufera (PBS) pH 7,4 i pH 4,0 korišćeni su kao sredstvo za bubrenje hidrogela. Mikrostrukturalna ispitivanja pokazala su uticaj AgNPs na kristalizaciju PVA. Pokazano je da su bubrenje i isporuka Ag u uzorcima AgNPs/PVA, koji su otapani u PBS pH 4,0, mali. Najveća isporuka srebra i bubrenje materijala bilo je u slučaju onih kompozita koji su pripremani sa 0,50% AgNO₃, ali su ti uzorci pokazali najmanju čvrstoću u rastvorima PBS pH 7,4 i 4,0. Uzorci AgNPs/PVA su bili netoksični i pokazali su antimikrobno delovanje pri koncentraciji srebra od 0,25%, što potvrđuje da je navedena koncentracija AgNO₃ dovoljna za uspostavljanje antimikrobnog efekta. Uzorci su pokazali adekvatna mehanička svojstva i bubrenje u svim medijima, što ih preporučuje kao potencijalni materijal za obloge kod lečenja opekotina [Oliviera i sar., 2014].

Podvlačimo da se rezultati ove doktorske disertacije, koji se odnose na biokompatibilnost AgNPs/PVA, iako indirektno, slažu sa napred opisanim istraživanjima i da potvrđuju biokompatibilnost AgNPs/PVA hidrogela u *in vivo* uslovima. Međutim, ukoliko se ovi materijali predviđaju za dugoročnu upotrebu kao mekotkivni implantati, potrebno je sprovesti dugoročna ispitivanja, s obzirom da su eksperimenti Nakamura i sar. pokazali kancerogena svojstva PVA hidrogela. Naime, 24-mesečno praćenje po 50 pacova sa supkutano aplikovanim tankim pločama

hidrogelova PVA sa 20% i 80% vode, pokazalo je da se kod skoro 30% životinja u okviru svake ispitivane grupe razvio maligni tumor mekih tkiva (fibrosarkom ili fibrohistiocitom) [Nakamura i sar., 2001].

Za kontekst ovog istraživanja, s obzirom na primenu u *in vivo* eksperimentima **novosintetisanog kompozitnog hidrogela AgNPs/PVA/Gr**, važno je elaborirati istudije o nanokompozitima PVA i grafena, a naročito o nanokompozitima PVA, grafena i AgNPs, kako u pogledu **njihovih fizičko-hemijskih osobina**, tako i u pogledu ispitivanja **biokompatibilnosti u *in vitro*, a naročito u *in vivo* uslovima**.

Opisano je da dodatak samo 0,5 wt% grafena (Gr) čini PVA/Gr nanokompozitni hidrogel i do 212% jačim prilikom rastezanja i 34% čvršćim na izduživanje do granice pucanja. Merenja pokazuju da se nivo apsorpcije vode kod PVA/Gr kompozita smanjuje sa 105,2% na 48,8%, sa očiglednim poboljšanjem svojstava barijere. Za razliku od čistih PVA polimera koji su izrazito hidrofilni ($\theta < 90^\circ$), merenja kontaktnih uglova su pokazala da su PVA/Gr kompoziti zapravo hidrofobni ($\theta > 90^\circ$) [Wang i sar., 2011].

S druge strane, poznato je da biointerakcije materijala na bazi grafena zavise od njihovih fizičko-hemijskih osobina. Ove osobine moguće je menjati adsorpcijom polimera na grafenske partikule. Tako su Pinto i sar. modifikovali grafenske nanopločice (GrNP) sa PVA, hidroksietil celulozom (HEC), polietilen glikolom (PEG), PVP, hondroitinom, glukozaminom i hijaluronskom kiselinom. Ti materijali su okarakterisani preko skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), DLS, XPS, Raman – spektroskopijom i termogravimetrijskom analizom (TGA). Za sve polimere potvrđena je površinska adsorpcija. Procena biološke kompatibilnosti pokazala je da su svi navedeni materijali izazvali malu hemolizu (<1.7%) pri koncentracijama do 500 μgml^{-1} . Kompoziti GrNP/PVA i GrNP/HEC pokazali su najniži procenat hemolize i zbog toga su dalje detaljno proučeni. U tom cilju ispitivana je morfologija HFF-1 ćelija (humanih fibroblasta prepucijuma) svetlosnom, fluorescentnom i transmissionom elektronskom mikroskopijom, da bi se procenila interakcija sa navedenim grafenskim materijalima. Uočene su male partikule GrNP koje ulaze u ćelije i ta osobina penetracije je nezavisna od površinskog tretmana. Kod dodavanja u ćelijsku kulturu GrNP na koje nisu adsorbovani drugi materijali, pri koncentraciji od 50 μgml^{-1} , produkcija slobodnih kiseoničnih radikala (ROS) povećala se za 4,4 puta. Međutim u slučaju GrNP na koje je adsorbovan PVA, produkcija ROS bila je manja (3,3 puta), a u slučaju GrNP na koje je

adsorbovan HEC, produkcija ROS je bila veća (5,1puta). Resazurinski test je pokazao da su GrNP toksične za HFF-1 ćelije pri koncentracijama većim od 20 μgml^{-1} posle 24 sata, ali da se toksičnost smanjuje nakon 48 časova i 72 sata od aplikacije ovih nanopločica. Međutim, površinska adsorpcija PVA na GrNP učinila ih je netoksičnim u koncentracijama do 50 μgml^{-1} . Testovi vijabilnosti i ćelijske smrti pokazali su da je pri dozama od 20 μgml^{-1} i 50 μgml^{-1} ćelijska smrt značajno manja prilikom aplikacije GrNP sa adsorbovanim PVA, u poređenju sa nativnim, nemodifikovanim GrNP. Modifikacija sa HEC nije se pokazala biokompatibilnom, ali je PVA znatno poboljšao biokompatibilnost grafenskih nanopločica [Pinto i sar., 2016].

Xue i sar. su proučavali uticaj tri vrste PVA sa različitim molekulskim težinama na interakciju između PVA i GO. Štaviše, ispitivano je i dejstvo PVA na geliranje GO. Izvorni PVA hidrogel, kao i hibridni hidrogelovi PVA-GO, detaljno su okarakterisani različitim tehnikama uključujući FE-SEM, Furijeovu transformacijsku infracrvenu (FT-IR) spektroskopiju, TGA i reološka merenja. Rezultati su pokazali da, uz povećanje molekulske težine PVA, dodavanje GO može vrlo efikasno da podstakne geliranje PVA, što može da se reflektuje smanjenjem kritične koncentracije gela za PVA-GO hidrogelove. Eksperimenti sa apsorpcijom boja ukazuju da je toksična boja, tj. metilenplavo, čvrsto zarobljena u PVA-GO kserogelima. Takođe je pokazano da se geliranje PVA/GO kompozita može podstaći različitim supramolekularnim interakcijama, uključujući vezivanje vodonika i elektrostatsku interakciju. Ova istraživanja su pokazala da je kompozit PVA/GO dobar kandidat za pripremu "super" i "pametnih" hidrogelova i autori se nadaju da će podstaći dalja istraživanja o supramolekularnoj hemiji PVA, Gr i njegovih derivata [Xue i sar., 2015].

Ne postoje objavljene studije za *in vivo* biokompatibilnost novosintetisanih Ag/PVA/Gr hidrogelova namenjenih za medicinsku upotrebu. U ovoj doktorskoj disertaciji prvi put je pokazan odgovor mekog tkiva na nov Ag/PVA/Gr nanokompozitni hidrogel u poređenju sa već opisanim Ag/PVA hidrogelom. U *in vivo* eksperimentu korišćeni su nanokompozitni materijali na bazi hidrogelova PVA i PVA/Gr koji imaju svojstvo imobilizacije AgNPs (poznatih kao odlični antimikrobni agens), kao i njihovog postepenog otpuštanja, što je poželjno za medicinske zavoje i obloge nove generacije. Hidrogelovi PVA dobijeni su umrežavanjem, metodom cikličnog zamrzavanja i odmrzavanja vodenog rastvora 10 mas.% PVA. Takođe su, u

cilju poboljšanja mehaničkih svojstava PVA gelova, sintetisani kompoziti PVA sa grafenom (PVA/Gr). Inkorporacija nanočestica srebra u hidrogelne matrice postignuta je *in situ* elektrohemijском redukcijom jona srebra u hidrogelovima koji su bubrili 48h u rastvoru prekursora AgNO₃ [Abudabbus i sar., 2016; Abudabbus i sar., 2018].

Pre nego što se pristupilo *in vivo* eksperimentima, nanokompozitni hidrogelovi su prethodno dobro okarakterisani. Karakterizacija dobijenih nanokompozita izvršena je ispitivanjem njihove citotoksičnosti, kao i metodama atomske apsorpcione spektroskopije (AAS), ciklične voltimetrije (CV) i TGA. U cilju ispitivanja citotoksičnosti uzorcima hidrogelova je dodavana suspenzija mononuklearnih ćelija periferne krvi (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Za određivanje broja preživelih ciljnih ćelija korišćen je MTT test sa tetrazolijumom. Broj vijabilnih ćelija je procenjen na osnovu promena optičke apsorpcije ćelija tretiranih MTT, koja zavisi od aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze. **Testovi citotoksičnosti pokazali su dobru biokompatibilnost 0,25 mM Ag/PVA i Ag/PVA/Gr nanokompozita. Preživljavanje PBMCs u proseku je iznosilo 75,97%** [Abudabbus i sar., 2018].

Metoda ciklične voltimetrije (CV) imala je za cilj da ispita stepen inkorporacije AgNPs u PVA i PVA/Gr polimerne matrice. Voltometrijska ispitivanja su vršena na polikristalnoj Pt radnoj elektrodi u opsegu potencijala od 0,3 V do 1,0 V u odnosu na SCE, kako bi se dobio bolji uvid u redoks proces koji se javlja na površini Pt elektrode [Abudabbus i sar., 2018]. Takođe je ispitivana i brzina oslobađanja srebra iz Ag/PVA i Ag/PVA/Gr hidrogelova pod statičnim uslovima, tako što su uzorci potapani u rastvor fosfatnog pufera (PBS, pH 7,42) koji je sadržao KH₂PO₄ i K₂HPO₄. Koncentracija srebra koja je bila oslobođena iz hidrogela u PBS, merena je tokom 28 dana pomoću atomskog apsorpcionog spektrofotometra (PYU UNICAM; Philips, Eindhoven, Holandija) [Abudabbus i sar., 2018]. Ciklični voltamogrami nanokompozita Ag/PVA i Ag/PVA/Gr koncentracija 0,25 mM i 1,0 mM Ag, potvrdili su postojanje nanočestica srebra u umreženim matricama gelova. Dvadesetosmodnevni profili otpuštanja srebra, dobijeni merenjem koncentracija otpuštenog srebra metodom AAS, ukazuju na zadržavanje oko 35 % početne koncentracije srebra u Ag/PVA hidrogelu, kao i 20 % početne koncentracije u Ag/PVA/Gr, po završetku eksperimenta [Abudabbus i sar., 2018]. **Brže otpuštanje i slabije zadržavanje AgNPs u hidrogelovima Ag/PVA/Gr je, verovatno, posledica odbojnih elektrostatičkih interakcija između AgNPs i grafena, kao**

i destabilizujućeg uticaja grafena na Agm-PVA komplekse [Abudabbus i sar., 2018].

Termogravimetrijskom analizom (TGA), koja je korišćena za ispitivanje uticaja grafena na termička svojstva sintetisanih hidrogelova, dobijeni su rezultati koji su pokazivali da je dodavanje grafena u tako niskoj koncentraciji poboljšalo termičku stabilnost nanokompozitnih hidrogelova na bazi PVA [Abudabbus i sar., 2018]. Grafen je poznat kao materijal sa odličnim termičkim svojstvima, a mnoge studije pokazale su da ugrađivanje grafena (ili GO) unutar polimernih matrica, dovodi do poboljšane termičke stabilnosti i sporije termičke degradacije istih [Abudabbus i sar., 2016]. Podaci TGA su pokazali da Ag/PVA/Gr nanokompoziti, u poređenju sa Ag/PVA hidrogelovima, **poseduju poboljšanu termičku stabilnost i manji gubitak u masi, prvenstveno zbog inkorporacije termički stabilnog grafena u svojim matricama.**

Rezultati istraživanja biokompatibilnosti *in vivo*, prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazali su da, nakon supkutane aplikacije Ag/PVA/Gr pacovima, dolazi do vaskularne, nefibrotične integracije materijala u implantirano tkivo, što znači da je materijal biokompatibilan. Na osnovu minimalnog iritacionog indeksa, tanke vezivnotkivne kapsule formirane oko implantata bez značajno umnoženih kolagenih vlakana, slabe inflamacije, dobre vaskularizacije periimplantne zone i prisustva makrofaga u njoj, zaključili smo da se ovaj materijal, nakon supkutane aplikacije kod pacova praćene tokom 60 dana trajanja eksperimenta, integriše u tkivo po principu vaskularne nefibrotične integracije, pa je stoga biokompatibilan. Uvažavajući novopredložene standarde za ispitivanje biokompatibilnosti [Anderson, 2016; Ratner, 2016], istraživanja prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji nisu se ograničila samo na procenu tkivnog IrI u skladu sa standardom ISO 10993-6, već su, u skladu sa preporukom [Ratner, 2016] u vezi sa kvantitativnim pokazateljem biokompatibilnosti, određivani i kvantitativno ili semikvantitativno okarakterisani angiogeneza, debljina vezivnotkivne kapsule, količina kolagena u vezivnotkivnoj kapsuli i perikapsularnom supkutanom vezivnom tkivu, broj makrofaga i broj Langerhansovih džinovskih ćelija. Određivani su i ekspresija laminina, važnog proteina ECM, kao i proliferacija i apoptoza epitelnih ćelija u epidermisu kože iznad zone implantacije i fibroblasta u kapsuli i perikapsularnoj zoni. Rezultati dobijeni u *in vivo* eksperimentima i izneti u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazali su da su se, nakon supkutane aplikacije Ag/PVA/Gr hidrogela, tkivni IrI, broj leukocita u periimplantnoj zoni i debljina kapsule postepeno

manjivali tokom perioda praćenja sve do 60. postoperativnog dana. Na kraju ispitivanog perioda tkivni IrI je kod oba biomaterijala (Ag/PVA i Ag/PVA/Gr) imao istu vrednost kao i komercijalni biokompatibilni Suprasorb, tj. bio je u granicama minimalnog IrI. Kapsula je kod biomaterijala Ag/PVA/Gr 60. dana praćenja bila nešto deblja u odnosu na hidrogelove Ag/PVA i Suprasorb, što se može reći i za broj leukocita i broj Langerhansovih džinovskih ćelija u periimplantnoj zoni, uz povećan broj makrofaga u odnosu na Ag/PVA implantat. Uprkos uočenim razlikama, prethodno okarakterisane fizičko-hemijske osobine Ag/PVA/Gr hidrogela, dokazano antibakterijsko dejstvo i netoksičnost u *in vitro uslovima*, kao i rezultati dobijeni u *in vivo* uslovima, u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na to da je nosintetisani Ag/PVA/Gr hidrogel biokompatibilan. **Biokompatibilnost** materijala je jedan od najvažnijih uslova za njihovu uspešnu primenu u regeneraciji i reparaciji tkiva ljudi i životinja. U skladu sa standardom ISO-10993-1, aneks A, za implantirane materijale obavezno je da se odrede fizičko-hemijske karakteristike i citotoksičnost, a poželjno je da se u ispitivanja uključe i ispitivanje senzibilizacije tkiva, tkivnog iritacionog odgovora, pirogenih svojstava materijala, systemske akutne toksičnosti, subakutne, subhronične i hronične toksičnosti, hemokompatibilnosti, genotoksičnosti, karcinogenosti, toksičnosti na reproduktivni sistem nosioca implantata i embrionalni razvoj ploda i biodegradaciju. Novi materijali, kojih je sve više zahvaljujući velikom napretku u tehnološkim naukama, zahtevaju i nove standarde za ispitivanje biokompatibilnosti, ne samo zbog svojih vrlo specifičnih fizičko-hemijskih karakteristika, već i zbog sve veće primene različitih materijala u regenerativnoj medicini, zbog čega se posebno mora voditi računa o vrsti tkiva kojoj je materijal namenjen u cilju reparacije i regeneracije, tj. o specifičnosti morfologije i fiziologije datog tkiva. U tom smislu predlaže se ispitivanje citotoksičnosti na specifičnim ćelijskim linijama, a posebno na različitim linijama makrofaga, pravilna interpretacija reakcije oko stranog tela i nakupljanja makrofaga u periimplantnoj zoni, a naročito pravilno sagledavanje tzv. „vrućih tačaka“ biokompatibilnosti. Nažalost, za ispitivanje citotoksičnosti *in vitro* najčešće se koriste fibroblastne linije u kratkom vremenskom periodu, obično ne dužem od 7 dana, pa se na osnovu takvih nalaza i bez ispitivanja vremenske kinetike tvrdi da je materijal netoksičan i biokompatibilan. Zato se smatra da bi u budućnosti trebalo poštiti kriterijume u vezi ispitivanja citotoksičnosti u *in vitro*

uslovima, primenom vremenske kinetike i odgovarajućih ćelijskih linija, u zavisnosti od namene sintetisanog i implantiranog materijala. Sve je popularnije ispitivanje citotoksičnosti biomaterijala i fagocitoze, uključujući frustriranu fagocitozu na makrofagnim linijama dobijenim od leukemijskih ćelija i limfoma i uglavnom izdvojenim od glodara. Značajna razlika između ovih ćelijskih linija i standardnog testiranja na monocitima izdvojenim iz periferne krvi, ogleda se u tome što su monociti periferne krvi krajnje diferencirane ćelije koje ne podležu replikaciji, za razliku od makrofagnih leukemijskih i limfomskih linija [Anderson, 2016]. U svakom slučaju korisno je primeniti oba testiranja i imati kritičan odnos prema dobijenim rezultatima.

Tokom poslednjih dekada istraživači su bili naročito zainteresovani za proučavanje reakcije tipa oko stranog tela, koju karakteriše nakupljanje makrofaga i Langerhansovih džinovskih ćelija (fuzionisanih makrofaga) na dodirnoj površini između implantata i okolnog tkiva. Primećeno je da je broj ovih ćelija povećan u periimplantnoj zoni kod dokazano kancerogenih materijala, pa se smatralo da je nakupljanje makrofaga i džinovskih ćelija nepoželjna reakcija, tj. reakcija koja se ne može povezati sa dobrom biokompatibilnošću. Međutim, takva mišljenja su danas revidirana. Smatra se da je povećan broj makrofaga i džinovskih ćelija povezan sa povećanjem površine koju imaju voluminozniji implantati i da baš to povećanje rezultira smanjenjem tumorogeneze ili kancerogenosti. Pravilno tumačenje broja makrofaga i džinovskih ćelija u periimplantnoj zoni naročito je važno danas, kada se sve češće primenjuju nanomaterijali koji imaju veliku dodirnu površinu sa okolnim tkivom i koji se sve više koriste u tkivnom inženjerstvu za konstrukciju skafolda [Anderson, 2016]. U skladu sa ovakvim mišljenjem je i predlog Ratnera [Ratner, 2016] koji iznosi novu formulu za kvantitativnu procenu biokompatibilnosti, po kojoj je ista direktno proporcionalna broju makrofaga i odnosu M2/M1-polarizovanih makrofaga. U tom smislu i mi tumačimo povećan broj makrofaga i džinovskih ćelija u periimplantnoj zoni kod primene Ag/PVA/Gr prilikom njihove supkutane implantacije u svim terminima praćenja. Naše zapažanje da se ove ćelije vrlo rano javljaju nakon implantacije u skladu je sa nalazima drugih autora, na osnovu kojih se može zaključiti da se one pojavljuju u implantacionoj zoni već nakon 48h, što dalje prati pojava frustrirane fagocitoze 15. dana nakon implantacije, a potom inkapsulacija implantiranog materijala 2-3 sedmice nakon implantacije [Anderson i sar., 2008; Gordon i sar., 2014; Ratner, 2016; Kzhyshkowska i

sar., 2015; Ohashi i sar., 2015]. Makrofagi imaju ključnu ulogu u kaskadi imunoloških odgovora na implantirani materijal. Jedan od stalnih problema koji postoji oko nekih implantata jeste nesposobnost makrofaga da otklone inflamaciju i njihova tendencija da ostanu u stanju tzv. *frustrirane fagocitoze*. U toku inicijalne faze inflamacije, *proinflamatorni makrofagi* (M1-polarizovani) indukuju akutnu reakciju na traumu i strani materijal, dok *tolerogeni antiinflamatorni makrofagi* (M2-polarizovani) kontrolišu povlačenje inflamacije i indukuju sledeću fazu – zaceljenje. Međutim, implantirani materijali mogu da indukuju mešoviti pro- i antiinflamatorni fenotip i da, na taj način, potpomažu održavanje hronične inflamacije praćene infekcijom mikroorganizmima i neuspehom implantacije. Zato je jedan od načina da se spreči infekcija ili hronična inflamacija povezana sa ugradnjom implantata i time poboljša prihvatanje implantata, mogućnost manipulacije sa fenotipom makrofaga dobijenih od konkretnog pacijenta kome se ugrađuje implantat. Stoga u budućnosti imunomodulatorne osobine materijala za oblaganje implantata moraju biti u službi personalizovane medicine (tzv. personalizovane implantne terapije). M2-makrofagi uključeni su u povlačenje inflamacije i zarastanje rane. Oni sekretuju TGF- β , PDGF, MMPs, CCL7 i CCL8 koji stimulišu proliferaciju, migraciju i aktivaciju fibroblasta i povećavaju sintezu kolagena u miofibroblastima, pa tako podstiču fibrozu [Darbi i sar., 2014]. Iako se smatra da je M2-fenotip dominantan za funkciju implantata, neki faktori oslobođeni iz M2-makrofaga, kao što su CCL18 (CC hemokinski ligand 18), mogu da održe hroničnu inflamaciju i odlože zaceljenje [Gordon i sar., 2014; Kzhyshkowska i sar., 2015; Ohashi i sar., 2015]. Zbog svega iznetog, naša neposredna dalja istraživanja biće usmerena na markiranje i kvantitativizaciju M1- i M2- i određivanje indeksa M2/M1-makrofaga u periimplantnoj zoni oko Ag/PVA/Gr.

Prema Ratnerovoj formuli za procenu biokompatibilnosti, indeks biokompatibilnosti je veći ukoliko je vezivna kapsula oko implantata tanja (debljine do 200 μ m) i ukoliko je kod formirane kapsule manji sadržaj kolagenih vlakana, a istovremeno veća vaskularizacija kapsule i šire periimplantne zone. Upravo su *in vivo* istraživanja u našim eksperimentima potvrdila da se oko implantata od Ag/PVA/Gr stvara relativno tanka (oko 60 μ m), dobro vaskularizovana kapsula bez velike količine kolagenih vlakana, što odgovara Ratnerovim zahtevima za dobru biokompatibilnost. Zbog značaja inkapsulacije materijala, smatra se da će u budućim istraživanjima

biološkog odgovora na implantirane novosintetisane materijale biti uključeni i novi testovi, kao što su ispitivanje remodelovanja fibrozne kapsule putem fibroblastnih faktora rasta i tkivnih metaloproteinaza, kao i ispitivanje difuzibilnosti kapsule, s obzirom da su pored debljine bitne i njene funkcionalne karakteristike [Anderson, 2016].

Laminin je veliki heterodimerni glikoprotein ECM i najvažnija komponenta bazalne membrane. On poseduje vezujuće regione za kolagen, integrine, ćelijske domene i proteoglikane. Međusobnim povezivanjem stvara bazalnu membranu. On se smatra strukturalnim skafoldom u svim tkivima organizma i ima važnu ulogu u procesima diferencijacije, migracije i adhezije. Našim istraživanjima obuhvaćeno je i ispitivanje ekspresije laminina, kao važnog proteina uključenog u procese remodelovanja ECM u toku tkivne regeneracije i reparacije [Daley i sar., 2008]. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazali su široku distribuciju laminina u različitim ćelijama kože, uključujući pored epitelnih ćelija i mišićne i endotelne ćelije, kao i u ECM dermisa i vezivotkivne kapsule. Distribucija laminina u intaktnoj koži i supkutanom vezivnom tkivu u skladu je sa literaturnim podacima [Sorokin i sar., 1994; Schuler i Sorokin, 1995; Aumailley, 2013; Yousif i sar., 2013], ali dobijene rezultate u zoni implantata ne možemo da kompariramo sa podacima drugih autora, s obzirom da sa novosintetisanim Ag/PVA/Gr do sada nije bilo *in vivo* istraživanja. Naši rezultati su pokazali vrlo sličnu ekspresiju laminina u zoni implantacije, kao i u intaktnoj koži udaljenoj od zone implantacije, u slučaju supkutane implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr u 7. i 15. postoperativnom danu. Nakon toga stepen ekspresije je opao i bio je identičan u 30. i 60. postoperativnom danu za oba hidrogela, ali je ta ekspresija bila veća u odnosu na uzorke intaktne kontrolne kože. Smatramo da je povećana ekspresija laminina 7. i 15. postoperativnog dana nakon implantacije Ag/PVA/Gr, kao i veća ekspresija 30. i 60. postoperativnog dana u odnosu na intaktnu kožu, posledica njegove uključenosti u procese migracije, adhezije i diferencijacije ćelija u toku aktivnog remodelovanja tkiva izazvanog implantiranim materijalima.

Poznato je da je apoptoza uključena u procese zarastanja rane i regeneracije tkiva, sa osnovnom ulogom da odstrani inflamatorne ćelije i granulaciono tkivo [Reinke i Song, 2012; Yates i sar., 2012; Costanzo i sar., 2015], kao i da matične ćelije kože imaju važnu ulogu u ovim procesima [Ojeh i sar., 2015]. Rezultati u vezi sa

proliferacijom i apoptozom nakon implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr pokazali su da su proliferacija i apoptoza fibroblasta u periimplantnoj zoni zapaženi u slučaju aplikacije sva tri hidrogela u 7. 15. i 30. postoperativnom danu, dok u 60. danu nisu registrovani fibroblasti u proliferaciji i apoptozi, tj. njihov broj bio je zanemarljiv. Broj fibroblasta u proliferaciji i apoptozi bio je najveći u 15. i 30. postoperativnom danu u slučaju aplikacije Ag/PVA, i u 15. postoperativnom danu u slučaju aplikacije Ag/PVA/Gr. Takođe je pokazana stimulacija proliferacije keratinocita bazalnog sloja epidermisa, progenitornih matičnih ćelija kože 7. i 15. postoperativnog dana kod implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr. Rezultati istraživanja Linaresa i sar. su pokazali da kombinacija GO sa PVA umanjuje posledice dejstva GO na humane osteoblaste, a kovalentna veza između GO i PVA polimernog lanca dovodi do povećanja ćelijskog preživljavanja i porasta koncentracije IL-6, a redukuje apoptozu i sadržaj intracelularnog ROS. Korišćenjem navedene strategije menja se površina kontakta i redukuju se toksični efekti grafena, dok su istovremeno očuvana pojačana mehanička svojstva ovog kopolimera [Linares i sar., 2016]. **Naš zaključak u vezi sa dobijenim rezultatima** je da su stepen proliferacije i apoptoze fibroblasta u periimplantnoj zoni bili relativno uravnoteženi, pa su procesi regeneracije mogli nesmetano da se odvijaju. Istraživanja drugih autora su pokazala da kompozitni hidrogelovi na bazi GO poseduju poroznu strukturu koja ima sposobnost adsorpcije velike količine vode, što ih čini pogodnim za indukciju adhezije i ćelijskog rasta. Ovi hidrogelovi poseduju antibakterijsku aktivnost. [Nešović i sar., 2017]. Prisustvo AgNPs u kompozitnim hidrogelovima sa grafenom pokazalo je ubrzano zarastanje rana na animalnim modelima [Fan i sar., 2014]. Nedavno je proizveden novi PVA/GO/skrob/Ag polimerni nanokompozitni film. Unošenjem nanočestica GO značajno se povećava antimikrobna aktivnost ovih filmova, kako prema Gram-pozitivnim, tako i prema Gram-negativnim bakterijama [Usman i sar., 2016]. Međutim, neki radovi ukazuju na moguće direktne toksične efekte GO na humane osteoblaste [Linares i sar., 2016] i respiratorni sistem [Shang i sar., 2017].

Globalni zaključak o biokompatibilnosti kod *in vivo* aplikovanog Ag//PVA/Gr u supkutano tkivo pacova, na osnovu svih dobijenih parametara u *in vivo* eksperimentima, jetse da je ovaj materijal biokompatibilan jer lokalno pokreće i vodi biološke procese koji, kao krajnji cilj, imaju zarastanje rane, rekonstrukciju tkiva i integraciju materijala.

7. ZAKLJUČCI

1. Numerička vrednost indeksa tkivne iritacije na kraju posmatranog perioda, tj. 60. dana nakon supkutano aplikovanih novosintetisanih hidrogelova Ag/PVA i Ag/PVA/Gr, pokazala je da ovi hidrogelovi uzrokuju minimalnu iritaciju tkiva ($IrI=5$).
2. Debljina kapsule 60. postoperativnog dana oko implantiranog Ag/PVA bila je $57,49 \pm 15,90$, a oko implantiranog Ag/PVA/Gr $69,58 \pm 14,69$, što prema literaturnim podacima odgovara debljini kapsule koja se stvara oko dokazano biokompatibilnih materijala, počev od 30. dana nakon implantacije (granica dozvoljene debljine kapsule je $50 \mu\text{m} - 200 \mu\text{m}$).
3. Makrofagi su bili prisutni u značajnom broju u kapsularnoj i perikapsularnoj zoni kod oba implantirana hidrogela, u svim periodima posmatranja, a najviše u početnoj fazi regeneracije i reparacije (7. dana nakon implantacije hidrogelova) što, po literaturnim podacima direktno i pozitivno korelira sa stepenom biokompatibilnosti.
4. Prilikom aplikacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr na kraju perioda praćenja, u kapsuli je registrovana blaga ekspresija kolagena tipa III i kolagena tipa I, kao i značajna gustina krvnih sudova, što ukazuje na to da su aplikovani hidrogelovi doveli do malog stepena fibroze i značajne vaskularizacije periimplantne zone. Ti podaci idu u prilog biokompatibilnosti, s obzirom da je stepen biokompatibilnosti obrnuto proporcionalan gustini kolagena u vezivnotkivnoj kapsuli, a direktno proporcionalan angiogenezi.
5. Obrazac ekspresije laminina u koži i zoni implantacije kod aplikacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr pokazuje da ovaj važan protein velike molekulske mase uzima učešće u remodelovanju ECM kože i supkutanog vezivnog tkiva prilikom regeneracije tkiva nakon implantacije Ag/PVA i Ag/PVA/Gr.
6. Rezultati koji govore o indeksu proliferacije keratinocita u epidermisu kože iznad implantirane zone i fibroblasta u zoni implantacije, kao i rezultati koji pokazuju apoptozu navedenih ćelijskih entiteta u istim zonama, pokazali su da ovi procesi uzimaju učešće u regeneraciji i reparaciji tkiva i da stoje u međusobnoj ravnoteži, što doprinosi uspešnosti oporavka tkiva nakon aplikovanih Ag/PVA i Ag/PVA/Gr.

7. Prisustvo Langerhansovih džinovskih ćelija oko obe vrste implantata, kao i određeni prodor makrofaga u implantate, ukazuju na učešće procesa frustrirane fagocitoze i fagocitoze u uspostavljanju adekvatnog imunološkog odgovora u tkivu na implantirane Ag/PVA i Ag/PVA/Gr.

8. Hidrogelovi aplikovani *in vivo* nisu se značajno menjali u veličini nakon 60. dana boravka u supkutanom tkivu pacova.

9. Na osnovu relativno dugog praćenja životinja sa supkutano implantiranim Ag/PVA i Ag/PVA/Gr i rezultata koji pokazuju da su ova dva hidrogela bila *in situ* relativno nepromenjene veličine, a da se oko implantata u vezivnom tkivu zadržao mali stepen inflamatorne reakcije, može da se izvede zaključak o biotolerantnosti organizma na ove hidrogelove.

10. Kao globalni zaključak o biokompatibilnosti kod *in vivo* aplikovanih Ag/PVA i Ag/PVA/Gr u supkutano tkivo pacova, na osnovu svih dobijenih parametara možemo da zaključimo da su oba materijala biokompatibilna jer lokalno pokreću i vode biološke procese koji, kao krajnji cilj, imaju zarastanje rane, rekonstrukciju tkiva i integraciju materijala. Oba implantirana hidrogela dovode do stvaranja tanke kapsule sa malom količinom kolagena, indukuju stvaranje dobro vaskularizovane vezivnotkivne kapsule i perikapsularnog supkutanog vezivnog tkiva i stimulišu invaziju makrofaga koji, verovatno, pozitivno regulišu procese regeneracije, bez prateće fibroze.

11. Razlike u ispitivanim parametrima između aplikovanih Ag/PVA i Ag/PVA/Gr ukazuju da se u slučaju aplikacije Ag/PVA/Gr stvara deblja kapsula, nešto jače infiltrirana inflamatornim ćelijama i sa većim brojem Langerhansovih džinovskih ćelija, ali istovremeno i sa većim brojem makrofaga koji su se registrovali u implantatu i nakon 60. dana od aplikacije ovog hidrogela. To ukazuje da dodavanje grafena u Ag/PVA može na specifični način da modulira različite biološke odgovore tkiva u toku procesa zarastanja rane, regeneracije i integracije.

8. LITERATURA

1. Abdelgawad AM, Hudson SM, Rojas OJ. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydr Polym.* 2014;100:166–178.
2. Abudabbus MM, Jevremović I, Janković A, Perić-Grujić A, Matić I, Vukašinović-Sekulić M, Hui D, Rhee KY, Mišković-Stanković V. Biological activity of electrochemically synthesized silver doped polyvinyl alcohol/graphene composite hydrogel discs for biomedical applications. *Compos Part B Eng.* 2016;104:26–34.
3. Abudabbus MM, Jevremović I, Nešović K, Perić-Grujić A, Rhee KY, Mišković-Stanković V. In situ electrochemical synthesis of silver-doped poly(vinyl alcohol)/graphene composite hydrogels and their physico-chemical and thermal properties. *Compos Part B.* 2018;140:99–107.
4. Ahadian S, Ramón-Azcón J, Chang H, Liang X, Kaji H, Shiku H, Nakajima K, Ramalingam M, Wu H, Matsue T. Electrically regulated differentiation of skeletal muscle cells on ultrathin graphene-based films. *RSC Adv.* 2014;4:9534–9541.
5. Akhavan O, Ghaderi E, Shahsavari M. Graphene nanogrids for selective and fast osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Carbon.* 2013;59:200–211.
6. Akhtar MF, Hanif M, Ranjha NM. Methods of synthesis of hydrogels. A review. *Saudi Pharm J.* 2016;24(5):554–559.
7. Akita S, Akino K, Imaizumi T, Hirano A. Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16:635–641.
8. Alexandre N, Ribeiro J, Gärtner A, Pereira T, Amorim I, Fragoso J, Lopes A, Fernandes J, Costa E, Santos-Silva A, Rodrigues M, Santos JD, Mauricio AC, Luis AL. Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting – In vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102:4262–4275.
9. Anderson JM, Rodriguez M, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008 ;20(2):86–100.
10. Anderson JM. Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility. *Regen Biomater.* 2016;3(2):73–77.

11. Ang PK, Li A, Jaiswal M, Wang Y, Hou HW, Thong JTL, Lim CT, Loh KP. Flow sensing of single cell by graphene transistor in a microfluidic channel. *Nano Lett.* 2011;11:5240–5246.
12. Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galie M, Sbarbati A, Krampera M, Belluzzi O, Bonetti B. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008;17:909–916.
13. Annabi N, Shin SR, Tamayol A, Miscuglio M, Bakooshi MA, Assmann A, Mostafalu P, Sun JY, Mithieux S, Cheung L, Tang XS, Weiss AS, Khademhosseini A. Highly Elastic and Conductive Human-Based Protein Hybrid Hydrogels. *Adv. Mater.* 2016;28(1):40–49.
14. Aumailley M. The laminin family. *Cell Adhes Migr.* 2013;7(1):48–55.
15. Avouris P. Graphene: Electronic and Photonic Properties and Devices, *Nano Lett.* 2010;10:4285–4294.
16. Baker MI, Walsh SP, Schwartz Z, Boyan BD. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012;100(5):1451–1457.
17. Bakhshandeh H, Soleimani M, Hosseini SS, Hashemi H, Shabani I, Shafiee A, Nejad AHB, Erfan M, Dinarvand R, Atyabi F. Poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous ring surrounding a polyvinyl alcohol hydrogel for the development of a biocompatible two-part artificial cornea. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:1509–1515.
18. Baruhović J. Grafen – u susret budućnosti. *Planeta.* 2014;9(62):1–2.
19. Basak P, Adhikari B. Poly (vinyl alcohol) hydrogels for pH dependent colon targeted drug delivery. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(1):137–146.
20. Batista NA, Rodrigues AA, Bavaresco VP, Mariolani JRL, Belangero WD. Polyvinyl alcohol hydrogel irradiated and acetalized for osteochondral defect repair: mechanical, chemical, and histological evaluation after implantation in rat knees. *Internat J Biomat.* 2012;2012:582685.
21. Bergmann NM, Peppas NA. Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins. *Prog Polym Sci.* 2008;33:271–288.
22. Bichara DA, Zhao X, Hwang NS, Bodugoz-Senturk H, Yaremchuk MJ, Randolph MA, Muratoglu OK. Porous poly(vinyl alcohol)-alginate gel hybrid construct for neocartilage formation using human nasoseptal cells. *J Surg Res.* 2010;163:331–336.

23. Brodbeck WG, Patel J, Voskerician G, Christenson E, Shive MS, Nakayama Y, Matsuda T, Ziats NP, Anderson JM. Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99(16):10287–10292.
24. Castro Neto AH, Guinea F, Peres NMR, Novoselov KS, Geim AK, The electronic properties of graphene., *Rev Mod Phys*. 2009; 81:109–162.
25. Chapman RG, Ostuni E, Takayama S, Holmlin RE, Yan L, Whitesides GM. Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins. *J Am Chem Soc*. 2000;22: 8303–8304.
26. Chen GY, Pang DWP, Hwang SM, Tuan HY, Hu YC. A Graphene-based platform for induced pluripotent stem cell culture and differentiation. *Biomaterials*. 2012;33:418–427.
27. Chen GY, Yang HJ, Lu CH, Chao YC, Hwang SM, Chen CL, Lo KW, Sung LY, Luo WY, Tuan HY, Hu YC. Simultaneous induction of autophagy and Toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. *Biomaterials*. 2012;33:6559–6569.
28. Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF. Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *P Soc Exp Biol Med*. 1979;161(3):337–340.
29. Cohen IK, Moore CD, Diegelmann RF. Onset and localization of collagen synthesis during wound healing in open rat skin wounds. *P Soc Exp Biol Med*. 1979;160(4),458–462.
30. Collins WR, Schmois E, Swager TM. Graphene oxide as an electrophile for carbon nucleophiles. *Chem Commun*. 2011;47:8790–8792.
31. Costanzo A, Fausti F, Spallone G, Moretti F, Narcisi A, Botti E. Programmed cell death in the skin. *Int J Dev Biol*. 2015;59(1-3):73–78.
32. Cruise GM, Hegre OD, Lamberti FV, Hager SR, Hill R, Scharp DS, Hubbell JA. In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes. *Cell Transplant*. 1999;8(3):293–306.
33. D'Emanuele A, Staniforth JN. An electrically modulated drug delivery device: I. *Pharm Res*. 1991;8:913–918.
34. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front Microbiol*. 2016;7:1831.

35. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 2008;121:255–264.
36. Daniels TR, Younger AS, Penner MJ, Wing KJ, Miniaci-Coxhead SL, Pinsker E, Glazebrook M. Midterm outcomes of polyvinyl alcohol hydrogel hemiarthroplasty of the first metatarso-phalangeal joint in advanced hallux rigidus. *Foot Ankle Int.* 2017;38:243–247.
37. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;7:301–311.
38. Dashtdar H, Murali MR, Abbas AA, Suhaeb AM, Selvaratnam L, Tay LX, Kamarul T. PVA-chitosan composite hydrogel versus alginate beads as a potential mesenchymal stem cell carrier for the treatment of focal cartilage defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23:1368–1377.
39. De Merlis CC, Schoneker DR. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem Toxicol.* 2003;41:319–326.
40. Deerenberg EB, Mulder IM, Ditzel M, Slieker JC, Bemelman WA, Jeekel J, Lange JF. Polyvinyl alcohol hydrogel decreases formation of adhesions in a rat model of peritonitis. *Surg Infect (Larchmt).* 2012;13:321–325.
41. Di CA, Wei D, Yu G, Liu Y, Guo Y, Zhu D. Patterned graphene as source/drain electrodes for bottom-contact organic field-effect transistors. *Adv Mater.* 2008;20:3289–3293.
42. Dimiev AM, Alemany LB, Tour JM. Graphene Oxide. Origin of acidity, its instability in water, and a new dynamic structural model. *ACS Nano.* 2012;7:576–588.
43. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev.* 2010;39:228–240.
44. Duch MC, Budinger GRS, Liang YT, Soberanes S, Urich D, Chiarella SE, Campochiaro LA, Gonzalez A, Chandel NS, Hersam MC, Mutlu GM. Minimizing oxidation and stable nanoscale dispersion improves the biocompatibility of graphene in the lung. *Nano Lett.* 2011;11:5201–5207.
45. Eda G, Chhowalla M. Chemically derived graphene oxide: towards large-area thin-film electronics and optoelectronics. *Adv Mater.* 2010; 22:2392–2415.
46. Esfandiari A, Akhavan O, Irajizad A. Melatonin as a powerful bio-antioxidant for reduction of graphene oxide. *J Mater Chem.* 2011;21:10907–10914.

47. Fan H, Wang L, Zhao K, Li N, Shi Z, Ge Z, Jin Z. Fabrication, mechanical properties, and biocompatibility of graphene-reinforced chitosan composites. *Biomacromolecules*. 2010;11:2345–2351.
48. Fan Z, Liu B, Wang J, Zhang S, Lin Q, Gong P, Ma L, Yang S. A novel wound dressing based on Ag/graphene polymer hydrogel: effectively kill bacteria and accelerate wound healing. *Adv Funct Mater*. 2014;24:3933–3943.
49. Feng ZQ, Wang T, Zhao B, Li J, Jin L. Soft graphene nanofibers designed for the acceleration of nerve growth and development. *Adv Mater*. 2015;27(41):6462–6468.
50. Feron K, Lim R, Sherwood C, Keynes A, Brichta A, Dastoor PC. Organic bioelectronics: Materials and biocompatibility. *Int J Mol Sci*. 2018;19:2382.
51. Ferreira L, Vidal MM, Gil MH. Evaluation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values. *Int J Pharm*. 2000;194:169–180.
52. Finch CA. *Polyvinyl alcohol – Developments*. John Wiley & Sons Ltd., United Kingdom, 1992.
53. Gadea JL, Cesteros LC, Katime I. Chemical–physical behavior of hydrogels of poly(vinyl alcohol) and poly(ethylene glycol). *Eur Polymer J*. 2013;49:3582–3589.
54. Gao XF, Jang J, Nagase S. Hydrazine and thermal reduction of graphene oxide: reaction mechanisms, product structures, and reaction design. *J Phys Chem C*. 2010;114:832–842.
55. Gehrke SH, Lee PI. Hydrogels for drug delivery systems. In: Tyle P. *Specialized Drug Delivery Systems*. New York, USA: Marcel Dekker; 1990, p. 333.
56. Geim AK. Graphene: Status and prospects. *Science*. 2009;324(5934):1530–1534.
57. Gonzalez JS, Ludueña LN, Ponce A, Alvarez VA. Poly(vinyl alcohol)/ cellulose nanowhiskers nanocomposite hydrogels for potential wound dressings. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;34:54–61.
58. Gordon S, Püddemann A, Estrada FM. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological Reviews*. 2014;262:36–55.
59. Gretzer C, Emanuelsson L, Liljensten E, Thomsen P. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2006;17(6):669–687.

60. Guazzo R, Gardin C, Bellin G, Sbricoli L, Ferroni L, Ludovichetti FS, Piattelli A, Antoniac I, Bressan E, Zavan B. Graphene-Based Nanomaterials for Tissue Engineering in the Dental Field. *Nanomaterials (Basel)*. 2018;8:E49.
61. Guo Y, Guo J, Bai D, Wang H, Zheng X, Guo W, Tian W. Hemiarthroplasty of the shoulder joint using a custom-designed high-density nano-hydroxyapatite/polyamide prosthesis with a polyvinyl alcohol hydrogel humeral head surface in rabbits. *Artif Organs*. 2014;38(7):580–586.
62. Gurunathan S, Han J, Kim JH. Humanin: a novel functional molecule for the green synthesis of graphene. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;111:376–383.
63. Gurunathan S, Han JW, Kim ES, Park JH, Kim JH. Reduction of graphene oxide by resveratrol: a novel and simple biological method for the synthesis of an effective anticancer nanotherapeutic molecule. *Int J Nanomed*. 2015;10:2951–2969.
64. Gurunathan S, Kim JH. Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical application of graphene and graphene-related materials. *Int J Nanomed*. 2016;11:1927–1945.
65. Gurunathan S, Woong Han J, Kim E, Kwon DN, Park JK, Kim JH. Enhanced green fluorescent protein-mediated synthesis of biocompatible graphene. *J Nanobiotechnol*. 2014;12(1):41.
66. Gutowska A, Bae YH, Feijen J, Kim SW. Heparin release from thermosensitive hydrogels. *J Control Release*. 1992;22:95–104.
67. Hajeeassa KS, Hussein MA, Anwar Y, Tashkandi NY, Al-Amshany ZM. Nanocomposites containing polyvinyl alcohol and reinforced carbon-based nanofiller: A super effective biologically active material. *Nanobiomed. (Rij)*. 2018;5:1–12.
68. Hall CE, Hall O. Polyvinyl alcohol: relationship of physicochemical properties to hypertension and other pathophysiologic sequelae. *Lab Invest*. 1963;12:721–736.
69. Hayes JC, Kennedy JE. An evaluation of the biocompatibility properties of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for a knee meniscus application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;59:894–900.
70. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003;24:4385–4415.
71. Hong SW, Lee JH, Kang SH, Hwang EY, Hwang YS, Lee MH, Han DW, Park JC. Enhanced neural cell adhesion and neurite outgrowth on graphene-based biomimetic substrates. *Biomed Res. Int*. 2014;212149.

72. Hummers WS, Offeman RE. Preparation of graphitic oxide. *J Am Chem Soc.* 1958;80:1339–1339.
73. Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, Kita M, Ogura Y, Honda Y. Poly (vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1994;5:397–406.
74. Jakus AE, Secor EB, Rutz AL, Jordan SW, Hersam MC, Shah RN. Three-dimensional printing of high-content graphene scaffolds for electronic and biomedical applications. *ACS Nano.* 2015;9:4636–4648.
75. James MA, Analiz R, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86–100.
76. Jastrzębska AM, Kurtycz P, Olszyna AR. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *J Nanopart Res.* 2012;14(12):1320–1340.
77. Jiang H, Zuo Y, Zhang L, Li J, Zhang A, Li Y, Yang X. Property-based design: optimization and characterization of polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel and PVA-matrix composite for artificial cornea. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25:941–952.
78. Jiang L, Dai Y, Cui F, Pan Y, Zhang H, Xiao J, Xiaobing FU. Expression of cytokines, growth factors and apoptosis-related signal molecules in chronic pressure ulcer wounds healing. *Spinal Cord.* 2014;52(2):145–151.
79. Johnson A, DiPietro LA. Apoptosis and angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis. *Faseb J.* 2013;27(10):3893–3901.
80. Kaity S, Isaac J, Ghosh A. Interpenetrating polymer network of locust bean gum-poly (vinyl alcohol) for controlled release drug delivery. *Carbohydr Polym.* 2013;94:456–467.
81. Kamoun EA, Kenawy ES, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J Adv Res.* 2017;8:217–233.
82. Kelly CM, De Merlis CC, Schoneker DR, Borzelleca JF. Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:719–727.
83. Kenawy ER, Kamoun EA, Mohy Eldin MS, El-Meligy MA. Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications. *Arab J Chem.* 2014;7:372–380.
84. Kim H, Abdala AA, Macosko CW. Graphene/polymer nanocomposites. *Macromolecules.* 2010;43:6515–6530.

85. Kim S, Ku SH, Lim SY, Kim JH, Park CB. Graphene–biomineral hybrid materials. *Adv Mater.* 2011;23:2009–2014.
86. Kim TH, An DB, Oh SH, Kang MK, Song HH, Lee JH. Creating stiffness gradient polyvinyl alcohol hydrogel using a simple gradual freezing-thawing method to investigate stem cell differentiation behaviors. *Biomaterials.* 2015;40:51–60.
87. Kobayashi M, Hyon HS. Development and evaluation of polyvinyl alcohol-hydrogels as an artificial articular cartilage for orthopedic implants. *Materials.* 2010;3:2753–2771.
88. Kobayashi M, Oka M. Composite device for attachment of polyvinyl alcohol-hydrogel to underlying bone. *Artif Organs.* 2004;28:734–738.
89. Kobayashi M, Togushida J, Oka M. Development of polyvinyl alcohol-hydrogel shields with a high water content for tendon injury repair. *J Hand Surg Br.* 2001;26:436–440.
90. Korbekandi H, Iravani S. Silver Nanoparticles. In: Abbass AH. *The Delivery of Nanoparticles.* Rijeka, Croatia: InTech; 2012, 3–36.
91. Kostarelos K, Novoselov KS. Materials Science. Exploring the interface of graphene and biology. *Science.* 2014;344:261–263.
92. Kraehenbuehl TP, Ferreira LS, Zammaretti P, Hubbell JA, Langer R. Cell-responsive hydrogel for encapsulation of vascular cells. *Biomaterials.* 2009;30(26):4318–4324.
93. Kundu J, Poole-Warren LA, Martens P, Kundu SC. Silk fibroin/poly(vinyl alcohol) photocrosslinked hydrogels for delivery of macromolecular drugs. *Acta Biomater.* 2012;8:1720–1729.
94. Kyung JH, Yeon KS, Jeong KS, Moo LY. pH / temperature-responsive semi-IPN hydrogels composed of alginate and poly(N-isopropylacrylamide). *J Appl Polym Sci.* 2002;83:128–136.
95. Kzyshkowska J, Gudima A, Riabov V, Dollinger C, Lavallo P, Vrana NE. Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine. *J Leukoc Biol.* 2015;98:953–962.
96. Larrañeta E, Stewart S, Ervine M, Al-Kasasbeh R, Donnelly RF. Hydrogels for hydrophobic drug delivery. Classification, Synthesis and Applications. *J Funct Biomater.* 2018;9:E13.

97. Lee EJ, Lee JH, Shin YC, Hwang D-G, Kim JS, Jin OS, Jin L, Hong SW, Han D-W. Graphene oxide-decorated PLGA/Collagen hybrid fiber sheets for application to tissue engineering scaffolds. *Biomater Res*. 2014;18:18–24.
98. Lee G, Kim BS. Biological reduction of graphene oxide using plant leaf extracts. *Biotechnol Progr*. 2014;30:463–469.
99. Lee JM, Sultan MT, Kim SH, Kumar V, Yeon YK, Lee OJ, Park CH. Artificial auricular cartilage using silk fibroin and polyvinyl alcohol hydrogel. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1707.
100. Lee WC, Lim CH, Kenry, Su C, Loh KP, Lim CT. Cell-assembled graphene biocomposite for enhanced chondrogenic differentiation. *Small*. 2015;11:963–969.
101. Lee WC, Lim CH, Shi H, Tang LA, Wang Y, Lim CT, Loh KP. Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. *ACS Nano*. 2011;5:7334–7341.
102. Li C, Fu R, Yu C, Li Z, Guan H, Hu D, Zhao D, Lu L. Silver nanoparticle/chitosan oligosaccharide/poly(vinyl alcohol) nanofibers as wound dressings: a preclinical study. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4131–4145.
103. Li H, Yang P, Pageni P, Tang C. Recent advances in metal-containing polymer hydrogels. *Macromol Rapid Commun*. 2017;38(14):1700109.
104. Li P, Jiang S, Yu Y, Yang J, Yang Z. Biomaterial characteristics and application of silicone rubber and PVA hydrogels mimicked in organ groups for prostate brachytherapy. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;49:220–234.
105. Li S, Dong S, Xu W, Tu S, Yan L, Zhao C, Ding J, Chen X. Antibacterial hydrogels. *Adv Sci (Wein)*. 2018;5(5):1700527.
106. Liao J, Qu Y, Chu B, Zhang X, Qian Z. Biodegradable CSMA/PECA/Graphene porous hybrid scaffold for cartilage tissue engineering. *Sci Rep*. 2015;5:9879.
107. Linares J, Matesanz MC, Feito MJ, Salavagione HJ, Martínez G, Gómez-Fatou M, Portolés MT. Influence of the covalent immobilization of graphene oxide in poly(vinyl alcohol) on human osteoblast response. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;138:50–59.
108. Liu CW, Xiong F, Jia HZ, Wang XL, Cheng H, Sun YH, Zhang XZ, Zhuo RX, Feng J. Graphene-based anticancer nanosystem and its biosafety evaluation using a Zebrafish model. *Biomacromolecules*. 2013;14:358–366.

109. Liu H, Cheng J, Chen F, Hou F, Bai D, Xi P, Zeng Z. Biomimetic and cell-mediated mineralization of hydroxyapatite by carrageenan functionalized graphene oxide. *ACS App Mater Interfaces*. 2014;6:3132–3140.
110. Liu J, Cui L, Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater*. 2013;9:9243–9257.
111. Liu J, Zheng H, Poh PSP, Maches HG, Schilling AF. Hydrogels for engineering of perfusable vascular networks. *Int J Mol Sci*. 2015;16:15997–16016.
112. Liu YZ, Li YF, Yang YG, Wen YF, Wang MZ. Reduction of graphene oxide by thiourea. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011;11:10082–10086.
113. Liu Z, Liu B, Ding J, Liu J. Fluorescent sensors using DNA-functionalized graphene oxide. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406:6885–6902.
114. Loo CY, Young PM, Lee WH, Cavaliere R, Whitchurch CB, Rohanizadeh R. Non-cytotoxic silver nanoparticle-polyvinyl alcohol hydrogels with anti-biofilm activity: designed as coatings for endotracheal tube materials. *Biofouling*. 2014;30:773–788.
115. Lorenzoni M, Brandi F, Dante S, Giugni A, Torre B. Simple and effective graphene laser processing for neuron patterning application. *Sci Rep*. 2013;3:1954.
116. Lozinsky VI. Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol) solutions. *Russ Chem Rev*. 1998;67:573–586.
117. Lu AH, Hao GP, Sun Q. Design of three-dimensional porous carbon materials: From static to dynamic skeletons. *Angew Chemie Int Ed Engl*. 2013;52:7930–7932.
118. Lu G, Yu K, Wen Z, Chen J. Semiconducting graphene: converting graphene from semimetal to semiconductor. *Nanoscale*. 2013;5:1353–1368.
119. Lu J, He YS, Cheng C, Wang Y, Qiu L, Li D, Zou D. Self-supporting graphene hydrogel film as an experimental platform to evaluate the potential of graphene for bone regeneration. *Adv Funct Mater*. 2013;23:3494–3502.
120. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 2005;23:47–55.
121. Luttikhuisen DT, Harmsen MC, Van Luyn MJ. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng*. 2006;12(7):1955–1970.

122. Machado NM, Lopes JC, Saturnino RS, Fagan EB, Nepomuceno JC. Lack of mutagenic effect by multiwalled functionalized carbon nanotubes in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol.* 2013;62:355–360.
123. Mak KF, Shan J, Heinz TF. Electronic structure a few-layer graphene: experimental demonstration of strong dependence on stacking sequence. *Phys Rev Lett.* 2010;104:176404.
124. Mallapragada SK, McCarthy-Schroeder S. Poly(Vinyl Alcohol) as a Drug Delivery Carrier. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Wise DL, editor, USA: CRC Press; 2000, 31–46.
125. Marinković S, Laušević Z, Polovina M. Savremeni karbonski materijali, monografija. Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd, 1999.
126. Marinković S. Novi ugljeni materijali (pregled). *Glasnik Hemijskog društva*, Beograd. 1978;43:795–815.
127. Marinković S. Pirokarboni i kompoziti karbon / karbon. Sve je to čist ugljenik kao i dijamant, ali vrlo vrlo različit, monografija. Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd, 2011.
128. Marten FL. Vinyl Alcohol Polymers. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. USA: John Wiley & Sons, Inc; 2002.
129. Masanori K, Hyon SH. Development and evaluation of polyvinyl alcohol-hydrogels as an artificial articular cartilage for orthopedic implants. *Materials.* 2010;3:2753–2771.
130. Matsumura S. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) and its copolymers. *Polymers Online*, 2005.
131. Mc Gann MJ, Higginbotham CL, Geever LM, Nugent MJ. The synthesis of novel pH-sensitive poly(vinyl alcohol) composite hydrogels using a freeze/ thaw process for biomedical applications. *Int J Pharm.* 2009;372:154–161.
132. Miller K: Immunocytochemical techniques. In: Bancroft J, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th Ed., London, UK: Churchill Livingstone; 2002, 421–464.
133. Moretto A, Tesolin L, Marsilio F, Schiavon M, Berna M, Varonese FM. Slow release of two antibiotics of veterinary interest from PVA hydrogels. *Farmaco.* 2004;59:1–5.

134. Moritz M, Geszke-Moritz M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chem Eng J.* 2013;228:596–613.
135. Mountuy PA, Snelling SJB, Dakin SG, Milković L, Gašparović AČ, Carr AJ, Žarković N. Biocompatibility of implantable materials: An oxidative stress viewpoint. *Biomaterials.* 2016;109:55–68.
136. Mouras S, Hamm A, Djurado D, Cousseins JC. Synthesis of first stage graphite intercalation compounds with fluorides. Gauthier-Villars, Paris, France, 1987.
137. Mu J, Hou C, Wang H, Li Y, Zhang Q, Zhu M. Origami-inspired active graphene-based paper for programmable instant self-folding walking devices. *Sci Adv.* 2015;1:e1500533.
138. Muppalaneni S, Omidian H. Polyvinyl alcohol in medicine and pharmacy: A perspective. *J Dev Drugs.* 2013;2(03):100–112.
139. Nakamura T, Ueda H, Tsuda T, Li YH, Kiyotani T, Inoue M, Matsumoto K, Sekine T, Yu L, Hyon SH, Shimizu Y. Long-term implantation test and tumorigenicity of polyvinyl alcohol hydrogel plates. *J Biomed Mater Res.* 2001;56:289–296.
140. Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X, Ee PLR, Ahn JH, Hong BH, Pastorin G, Özyilmaz B. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano.* 2011;5:4670–4678.
141. Nešović K, Abudabbus MM, Rhee KY, Mišković-Stanković V. Graphene Based Composite Hydrogel for Biomedical Applications. *Croat Chem Acta.* 2017;90:207–213.
142. Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2002;23:4307–4314.
143. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science.* 2004;306:666–669.
144. Novoselov KS, Jiang D, Schedin F, Booth TJ, Khotkevich VV, Morozov SV, Geim AK. Two-dimensional atomic crystals, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:10451–10453.
145. Novoselov KS. Graphene: Materials in the flatland. In: *Les prix Nobel: The Nobel Prizes 2010* (Karl Grandin, ed), Stockholm, 2011, 106–131.

146. Ohashi W, Hattori K, Hattori Y. Control of macrophage dynamics as a potential therapeutic approach for clinical disorders involving chronic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;354:240–250.
147. Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O. Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):25476–25501.
148. Oka M, Chang YS, Nakamura T, Ushio K, Toguchida J. Synthetic osteochondral replacement of the femoral articular surface. *J Bone Joint Surg B.* 1997;79-B:1003–1007.
149. Oliviera RN, Rouzé R, Quilty B, Alves GG, Soares GDA, Thiré RMSM, McGuinness GB. Mechanical properties and in vitro characterization of polyvinyl alcohol-nano-silver hydrogel wound dressings. *Interface Focus.* 2014;4:20130049.
150. Omidian H, Qiu Y, Yang S, Kim D, Park H, Park K. Hydrogels having enhanced elasticity and mechanical strength properties. US Patent No. 6960617 B2, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office; 2005.
151. Pal K, Banthia AK, Majumdar DK. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *AAPS PharmSciTech.* 2007;8:21.
152. Parhi R. Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: A review. *Adv Pharm Bull.* 2017;7(4):515–530.
153. Park J, Kim B, Han J, Oh J, Park S, Ryu S, Jung S, Shin JY, Lee BS, Hong BH, Choi D, Kim BS. Graphene Oxide Flakes as a Cellular Adhesive: Prevention of Reactive Oxygen Species Mediated Death of Implanted Cells for Cardiac Repair. *ACS Nano.* 2015;9:4987–4999.
154. Park J, Park S, Ryu S, Bhang SH, Kim J, Yoon JK, Park YH, Cho SP, Lee S, Hong BH, Kim BS. Graphene-regulated cardiomyogenic differentiation process of mesenchymal stem cells by enhancing the expression of extracellular matrix proteins and cell signaling molecules. *Adv Healthc Mater.* 2014; 3:176–181.
155. Park SY, Park J, Sim SH, Sung MG, Kim KS, Hong BH, Hong S. Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. *Adv Mater.* 2011;23:H263–267.

156. Pencheva D, Bryaskova R, Kantardjiev T. Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNPs) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C*. 2012;32:2048–2051.
157. Peppas NA, Kim B. Stimuli-sensitive protein delivery systems. *J Drug Del Sci Technol*. 2006;16:11–18.
158. Peppas NA. Intelligent biomaterials as pharmaceutical carriers in microfabricated and nanoscale devices. *MRS Bull*. 2006;31:888–893.
159. Perale G, Rossi F, Santoro M, Peviani M, Papa S, Llupi D, Torriani P, Micotti E, Previdi S, Cervo L, Sundström E, Boccaccini AR, Masi M, Forloni G, Veglianese P. Multiple drug delivery hydrogel system for spinal cord injury repair strategies. *J Control Release*. 2012;159:271–280.
160. Pérez-Garijo A, Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*. 2015;142(19):3253–3262.
161. Pinto AM, Moreira JA, Mogalhaes FD, Goncalves IC. Polymer surface adsorption as a strategy to improve the biocompatibility of graphene nanoplatelets. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;146:818–824.
162. Qu G, Liu S, Zhang S, Wang L, Wang X, Sun B, Yin N, Gao X, Xia T, Chen JJ, Jiang GB. Graphene oxide induces Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent necrosis in macrophages. *ACS Nano*. 2013;7:5732–5745.
163. Ratner BD. A pore way to heal and regenerate: 21st century thinking on biocompatibility. *Regen Biomater*. 2016;3:107–110.
164. Raza F, Zafar H, Zhu Y, Ren Y, Ullah A, Khan AU, He X, Han H, Aquib M, Boakye-Yiadom KO, Ge L. A Review on recent advances in stabilizing peptides/proteins upon fabrication in hydrogels from biodegradable polymers. *Pharmaceutics*. 2018;10:E16.
165. Reinke JM, Song H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012;49:35–43.
166. Romanchuk AY, Slesarev AS, Kalmykov SN, Kosynkin DV, Tour JM. Graphene oxide for effective radionuclide removal. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15(7):2321–2327.

167. Ruess G, Vogt F. Höchstlamellarer Kohlenstoff aus Graphitoxhydroxyd. Monatshefte für chemie und verwandte teile anderer wissenschaften. 1948;78(3-4):222–242.
168. Salas EC, Sun ZZ, Luttge A, Tour JM. Reduction of graphene oxide via bacterial respiration. ACS Nano. 2010;4:4852–4856.
169. Sanders JM, Matthews HB. Vaginal absorption of polyvinyl alcohol in Fischer 344 rats. Hum Exp Toxicol. 1990;9:71–77.
170. Saxena SK. Polyvinyl alcohol (PVA). Chemical and technical assessment (CTA). 61st JECFA, FAO, 2004;1(3):3–5.
171. Scaretta FV. 5 to 8 years follow-up of knee chondral defects treated by PVA-H hydrogel implants. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013;17:3031–3038.
172. Schuler F, Sorokin LM. Expression of laminin isoforms in mouse myogenic cells in vitro and in vivo. J Cell Sci. 1995;108(12):3795–3805.
173. Seabra AB, Paula AJ, de Lima R, Alves OL, Durán N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. Chem Res Toxicol. 2014;27:159–168.
174. Shang S, Li J, Zhao Y, Xi Z, Lu Z, Li B, Yang X, Li R. Oxidized graphene-aggravated allergic asthma is antagonized by antioxidant vitamin E in Balb/c mice. Environ Sci Pollut Res Int. 2017;24:1784–1793.
175. Sher F, Rossler R, Brouwer N, Balasubramanian V, Boddeke E, Copray S. Differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes: involvement of the polycomb group protein Ezh2. Stem Cells. 2008;26:2875–2883.
176. Shi X, Chang H, Chen S, Lai C, Khademhosseini A, Wu H. Regulating cellular behavior on few-layer reduced graphene oxide films with well-controlled reduction states. Adv Funct Mater. 2012;22:751–759.
177. Shin HJ, Kim KK, Benayad A, Yoon SM, Park HK, Jung IS, Jin MH, Jeong HK, Kim JM, Choi JY, Lee YH. Efficient reduction of graphite oxide by sodium borohydride and its effect on electrical conductance. Adv Funct Mater. 2009;19:1987–1992.
178. Shin SR, Aghaei-Ghareh-Bolagh B, Gao X, Nikkhah M, Jung SM, Dolatshahi-Pirouz A, Kim SB, Kim SM, Dokmeci MR, Tang XS, Khademhosseini A. Layer-by-layer assembly of 3D tissue constructs with functionalized graphene. Adv. Funct. Mater. 2014;24:6136–6144.

179. Shin SR, Li YC, Jang HL, Khoshakhlagh P, Akbari M, Nasajpour A, Zhang YS, Tamayol A, Khademhosseini A. Graphene-based materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016b;105(Pt B):255–274.
180. Shin SR, Zihlmann C, Akbari M, Assawes P, Cheung L, Zhang K, Manoharan V, Zhang YS, Yüksekaya M, Wan KT, Nikkhah M, Dokmeci MR, Tang XS, Khademhosseini A. Reduced graphene oxide-GelMA hybrid hydrogels as scaffolds for cardiac tissue engineering. *Small.* 2016a;12(27):3677–3689.
181. Shin YC, Song SJ, Hong SW, Jeong SJ, Chrzanowski W, Lee JC, Han DW. Multifaceted biomedical applications of functional graphene nanomaterials to coated substrates, patterned arrays and hybrid scaffolds. *Nanomaterials (Basel).* 2017;7:369.
182. Shokrgozar MA, Bonakdar S, Dehghan MM, Emami SH, Montazeri L, Azari S, Rabbani M. Biological evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel crosslinked by polyurethane chain for cartilage tissue engineering in rabbit model. *J Mater Sci Med.* 2013;24:2449–2460.
183. Solanki A, Chueng ST, Yin PT, Kappera R, Chhowalla M, Lee KB. Axonal alignment and enhanced neuronal differentiation of neural stem cells on graphene nanoparticle hybrid structures. *Adv Mater.* 2013;25:5477–5482.
184. Sood A, Granick MS, Tomaselli NL. Wound dressings and comparative effectiveness data. *Adv Wound Care.* 2014;3(8):511–529.
185. Sorokin L, Girg W, Göpfert T, Hallmann R, Deutzmann R. Expression of novel 400-kDa laminin chains by mouse and bovine endothelial cells. *Eur J Biochem.* 1994;223(2):603–610.
186. Stankovich S, Dikin DA, Piner RD, et al. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon.* 2007;45:1558–1565.
187. Stankovich S, Piner RD, Chen XQ, Wu NQ, Nguyen ST, Ruoff RS. Stable aqueous dispersions of graphitic nanoplatelets via the reduction of exfoliated graphite oxide in the presence of poly(sodium 4-styrenesulfonate). *J Mater Chem.* 2006;16:155–158.
188. Stensberg MC, Wei Q, McLamore ES, Porterfield DM, Wei A, Sepúlveda MS. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine (Lond).* 2011;6:879–898.

189. Su CV, Lu AY, Xu YP, Chen FR, Khlobystov AN, Li LJ. High-quality thin graphene films from fast electrochemical exfoliation. *ACS Nano*. 2011;5:2332–2339.
190. Suk JW, Piner RD, An J, Ruoff RS. Mechanical properties of monolayer graphene oxide. *ACS Nano*. 2010;4:6557–6564.
191. Sun X, Liu Z, Welscher K, Robinson J, Goodwin A, Zaric S, Dai H. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Res*. 2008;1:203–212.
192. Surudžić R, Janković A, Mitrić M, Matić I, Juranić ZD, Živković Lj, Mišković-Stanković V, Rhee KY, Park SJ, Hui D. The effect of graphene loading on mechanical, thermal and biological properties of poly (vinyl alcohol)/graphene nanocomposites. *J Ind Eng Chem*. 2016;34:250–257.
193. Surudžić R, Jovanović Ž, Bibić N, Nikolić B, Mišković-Stanković V. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles in poly(vinyl alcohol) solution. *J Serb Chem Soc*. 2013;78:2087–2098.
194. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, Eight ed., Elsevier, 2019.
195. Sydlik SA, Swager TM. Functional graphenic materials via a Johnson Claisen rearrangement. *Adv Funct Mater*. 2013;23:1873–1882.
196. Takigawa T, Kasihara H, Masuda T. Swelling and mechanical properties of polyvinyl alcohol hydrogels. *Polymer Bull*. 1990;58:135–142.
197. Taleb C, Berner S, Mantovani Ruggiero G. First metacarpal resurfacing with polyvinyl alcohol implant in osteoarthritis: preliminary study. *Chir Main*. 2014;33:189–195.
198. Tang M, Song Q, Li N, Jiang Z, Huang R, Cheng G. Enhancement of electrical signaling in neural networks on graphene films. *Biomaterials*. 2013;34:6402–6411.
199. Tang ZH, Wu XH, Guo BC, Zhang LQ, Jia DM. Preparation of butadiene-styrene-vinyl pyridine rubber-graphene oxide hybrids through co-coagulation process and in situ interface tailoring. *J Mater Chem*. 2012;22:7492–7501.
200. Tomić S, Janjetović K, Mihajlović D, Milenković M, Kravić-Stevović T, Marković Z, Todorović-Marković B, Spitalsky Z, Micusik M, Vučević D, Čolić M, Trajković V. Graphene quantum dots suppress proinflammatory T cell responses via autophagy-dependent induction of tolerogenic dendritic cells. *Biomaterials*. 2018;146:13–28.

201. Tošić D. Sinteza i karakterizacija grafenskih nanotraka, doktorska disertacija. Elektrotehnički fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2016.
202. Toyokuni S. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. *Adv Drug Delivery Rev.* 2013;65:2098–2110.
203. Usman A, Hussain Z, Riaz A, Khan AN. Enhanced mechanical, thermal and antimicrobial properties of poly(vinyl alcohol)/graphene oxide/starch/silver nanocomposites films. *Carbohydr Polym.* 2016;153:592–599.
204. Varaprasad K, Murali MY, Ravindra S, Narayana RN, Vimala K, Monika K, Sreedhar B, Mohana RK. Hydrogel-silver nanoparticle composites: A new generation of Antimicrobials. *J Appl Polym Sci.* 2009;115:1199–1207.
205. Venkatesan J, Pallela R, Kim SK. Applications of carbon nanomaterials in bone tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;10:3105–3123.
206. Wallace PR. The band theory of graphite. *Phys Rev.* 1947;71:622–634.
207. Wang J, Wang X, Xu C, Zhang M, Shang X. Preparation of graphene/poly(vinyl alcohol) nanocomposites with enhanced mechanical properties and water resistance. *Polym Int.* 2011;60:816–822.
208. Weaver CL, Cui XT. Directed neural stem cell differentiation with a functionalized graphene oxide nanocomposite. *Adv Health Mater.* 2015;4:1408–1416.
209. West JL, Hubbell JA. Separation of the arterial wall from blood contact using hydrogel barriers reduces intimal thickening after balloon injury in the rat: The roles of medial and luminal factors in arterial healing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:13188–13193.
210. Williams DF. *The Williams', dictionary of biomaterials.* Liverpool, UK: Liverpool University Press; 1999.
211. Wu JQ, Liu Y, Yang TF, Mu YH, Guo T, Li YB. Porous polyvinyl alcohol hydrogel composite prepared and studied initially for biocompatibility. *J Sichuan Univers. Medical science edition.* 2007;38:705–708.
212. Wu Q, Zhao Y, Li Y, Wang D. Molecular signals regulating translocation and toxicity of graphene oxide in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nanoscale.* 2014;6:11204–11212.
213. www.graphene-flagship.eu/project
214. www.graphene.manchester.ac.uk. Retrieved 2015-11-30.

215. Xu M, Zhang C, Luo Y, Xu L, Tao X, Wang Y, He H, Tang X. Application and functional characterization of POVACOAT, a hydrophilic co-polymer poly(vinyl alcohol/acrylic acid/methyl methacrylate) as a hot-melt extrusion carrier. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014;40:126–135.
216. Xu W, Dong S, Han Y, Li S, Liu Y. Hydrogels as antibacterial biomaterials. *Curr Pharm Des.* 2018;24:843–854.
217. Xue R, Xin X, Wang L, Shen J, Ji F, Li W, Jia C, Xu G. A systematic study of the effect of molecular weights of polyvinyl alcohol on polyvinyl alcohol-graphene oxide composite hydrogels. *Phys Chem Chem Phys.* 2015;17:5431–5440.
218. Yang D, Li T, Xu M, Gao F, Yang J, Yang Z, Le W. Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9:2445–2455.
219. Yang K, Han Q, Chen B, Zheng Y, Zhang K, Li Q, Wang J. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application. *Int J Nanomed.* 2018;13:2217–2263.
220. Yang K, Wan J, Zhang S, Tian B, Zhang Y, Liu Z. The influence of surface chemistry and size of nanoscale graphene oxide on photothermal therapy of cancer using ultra-low laser power. *Biomaterials.* 2012;33:2206–2214.
221. Yates CC, Hebda P, Wells A. Skin wound healing and scarring: fetal wounds and regenerative restitution. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2012;96:325–333.
222. Yoon HH, Bhang SH, Kim T, Yu T, Hyeon T, Kim BS. Dual roles of graphene oxide in chondrogenic differentiation of adult stem cells: Cell-adhesion substrate and growth factor-delivery carrier. *Adv Funct Mater.* 2014;24:6455–6464.
223. Yousif LF, Russo JD, Sorokin L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adhes Migr.* 2013;7:101–110.
224. Zhang F, Wu J, Kang D, Zhang H. Development of a complex hydrogel of hyaluronan and PVA embedded with silver nanoparticles and its facile studies on *Escherichia coli*. *J Biomater Sci Polim Ed.* 2013;24:1410–1425.
225. Zhang L, Xia J, Zhao Q, Liu L, Zhang Z. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small.* 2010;6:537–544.

226. Zhang W, Guo Z, Huang D, Liu Z, Guo X, Zhong H. Synergistic effect of chemophotothermal therapy using PEGylated graphene oxide. *Biomaterials*. 2011;32:8555–8561.
227. Zhao H, Ding R, Zhao X, Li Y, Qu L, Pei H, Yildirimer L, Wu Z, Zhang W. Graphene-based nanomaterials for drug and/or gene delivery, bioimaging, and tissue engineering. *Drug Discov Today*. 2017;22:1302–1317.
228. Zhu W, Ding J. Synthesis and characterization of a redox-initiated, injectable, biodegradable hydrogel. *J Appl Polym Sci*. 2006;99:2375.

Biografija

Tijana Lužajić Božinovski rođena je 08.01.1985. godine u Beogradu, gde je 1999. godine završila osnovnu školu. Iste godine upisala je XIII beogradsku gimnaziju, koju je završila 2003. godine sa odličnim uspehom.

Odmah po završetku srednje škole (2003. godine) upisala je Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Sve ispite predviđene nastavnim planom i programom Integriranih osnovnih i master akademskih studija uspešno je položila sa prosečnom ocenom 8,82, čime je stekla zvanje diplomiranog veterinara.

Doktorske akademske studije upisala je na matičnom fakultetu 2010. godine, a sve ispite predviđene nastavnim planom i programom položila je sa prosečnom ocenom 9,25. Od januara 2012. godine angažovana je na projektu „Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja” (broj projekta 175061, „Osnovna istraživanja“, „Medicina“, rukovodilac projekta prof. dr Milica Kovačević Filipović), u zvanju istraživača pripravnika.

Za asistenta na užoj naučnoj oblasti Histologija i embriologija izabrana je 01.10.2013. godine i od tada je aktivno uključena u pripremanje i izvođenje praktične nastave, praktičnog dela ispita i kolokvijuma iz predmeta Histologija sa embriologijom 1 i Histologija sa embriologijom 2. Pored toga, svakodnevno je angažovana u Histološkoj i imunohistohemijskoj laboratoriji Katedre za histologiju i embriologiju. Reizabrana je za asistenta na užoj naučnoj oblasti Histologija i embriologija 27. 09. 2016. godine.

Učestvovala je u programu naučne i tehnološke saradnje između Republike Srbije i Republike Francuske u periodu 2012-2013. godine, u međunarodnom projektu pod nazivom "Evaluacija i primena mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz sinovijalne tečnosti psa za terapiju osteoartritisa", rukovodilac projekta sa srpske strane prof. dr Milica Kovačević-Filipović.

U periodu od 2011. do 2015. godine bila je angažovana na međunarodnom projektu: COST Akcija MP 1005: "From nano to macro biomaterials (design, processing, characterization, modeling) and applications to stem cells regenerative orthopedic and dental medicine (NAMABIO)", rukovodilac projekta prof. dr Milica Kovačević-Filipović. U septembru 2012. godine prisustvovala je jednodnevnoj radionici

"Comparative embryonic stem cell research in mammals" u Budimpešti, a 2014. godine je bila učesnik u radionici organizovanoj na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu, pod nazivom: "The Belgrade Workshop on Farm Animal Proteomics", COST Akcija FA 1002. U saradnji sa Centrom za promociju nauke 2014. godine je učestvovala u organizaciji manifestacije "Dani Fakulteta veterinarske medicine, Zajedno sa životinjama", u Beogradu. U septembru 2017. godine prisustvovala je Zeiss-ovoj radionici: "Zeiss workshop of High-End microscopy", na Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković", u Beogradu.

Autor je jednog rada u međunarodnom časopisu (M23) i vodećem nacionalnom časopisu (M51). Koautor je u četiri rada u međunarodnim časopisima (M21, M22 i M23), jednog rada u vodećem nacionalnom časopisu (M51) i jednog rada saopštenog na međunarodnom skupu (M32). Autor je i koautor jednog saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampanog u celini (M63), šest saopštenja sa skupova međunarodnog značaja štampanih u izvodu (M34), kao i šest saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampanih u izvodu (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана: Тијана М. Лужајић Божиновски

број уписа: 15/15

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Испитивање биокompatибилности нанокoмпoзитних хидрогелoва сребро / поливинил алкохол / графен у поткожном ткиву пацова, намењених биомедицинској примени"

- 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 кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 01.11.2018. године



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Тијана М. Лужајић Божиновски

Број уписа: 15/15

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: "Испитивање биокompatибилности нанокoмпoзитних хидрогелова сребро / поливинил алкохол / графен у поткожном ткиву пацова, намењених биомедицинској примени."

Ментор: др Даница Марковић, ванредни професор

др Вера Тодоровић, редовни професор

Потписани: Тијана М. Лужајић Божиновски

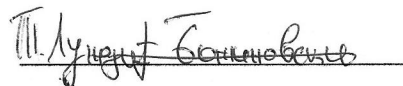
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, 01.11.2018. године



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Испитивање биокompatibilности нанокoмпoзитних хидрогелoва сребро / поливинил алкoхол / графен у поткoжном ткиву пацова, намењених биoмедицинској примени"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

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, 01.11.2018. године

