

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Marija S. Vukomanović

**Kontrolisano oslobađanje  
antibiotika iz nanosfera  
poli(D,L-laktid-  
kogliolid)/hidroksiapatita sintetisanih u  
ultrazvučnom polju**

doktorska disertacija

Beograd, 2011

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Marija S. Vukomanović

**Controlled release of antibiotic from  
poly(D,L lactide-co-  
glycolide)/hydroxyapatite nanospheres  
synthesized in the field of ultrasound**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2011

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

DOKTORSKA DISERTACIJA

**KONTROLISANO OSLOBAĐANJE ANTIBIOTIKA IZ NANOSFERA POLI(D,L-LAKTID-KO-GLIKOLID)/HIDROKSIAPATITA SINTETISANIH U ULTRAZVUČNOM POLJU**

mr MARIJA VUKOMANOVIĆ

BEOGRAD

2011.

**Mentori:**

**dr Dragan Uskoković**, naučni savetnik

Institut tehničkih nauka SANU, Beograd

---

**dr Gordana Ćirić-Marjanović**, vanredni profesor

Fakultet za fizičku hemiju, Beograd

---

**Članovi komisije:**

**dr Ljiljana Damjanović**, docent

Fakultet za fizičku hemiju, Beograd

---

**dr Vera Kapetanović**, profesor

Farmaceutski fakultet, Beograd

---

# SADRŽAJ

<b>SADRŽAJ</b> .....	<b>3</b>
<b>GRAFIČKI IZVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>IZVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>TEORIJSKI DEO</b> .....	<b>12</b>
1.1. UVOD .....	13
1.2. SAVREMENI SISTEMI ZA DOSTAVU MEDIKAMENATA .....	14
1.3. MULTIFUNKCIONALNI SISTEMI .....	22
1.3.1. <i>Materijali za formiranje multifunkcionalnih sistema</i> .....	24
1.3.2. <i>„Jezgro-omotač“ struktura multifunkcionalnih sistema</i> .....	27
1.3.3. <i>Tehnike procesiranja multifunkcionalnih sistema</i> .....	30
1.4. DOSTAVA ANTIBIOTIKA .....	36
1.4.1. <i>Infekcijske bolesti koštanog tkiva</i> .....	36
1.4.2. <i>Tradicionalna dostava antibiotika</i> .....	39
1.4.3. <i>Kontrolisana dostava antibiotika</i> .....	40
1.4.3.1. Princip kontrolisane dostave antibiotika .....	40
1.4.3.2. Prednosti kontrolisane dostave antibiotika .....	42
1.4.3.3. Nedostaci kontrolisane dostave antibiotika .....	43
1.5. MATERIJALI ZA KONTROLISANU DOSTAVU ANTIBIOTIKA .....	46
1.5.1. <i>Izbor antibiotika i uticaj svojstava leka na procese inkapsulacije i otpuštanja</i> .....	46
1.5.2. <i>Materijali za formiranje nosača antibiotika</i> .....	51
1.5.2.1. Polimerni materijali kao nosači antibiotika .....	52
Poli( <i>D,L</i> -laktid- <i>ko</i> -glikolid) kao nosač antibiotika .....	55
1.5.2.2. Biokeramički materijali kao nosači antibiotika .....	58
Hidroksiapatit kao nosač antibiotika .....	59
1.5.2.3. Kompoziti kao nosači antibiotika .....	60

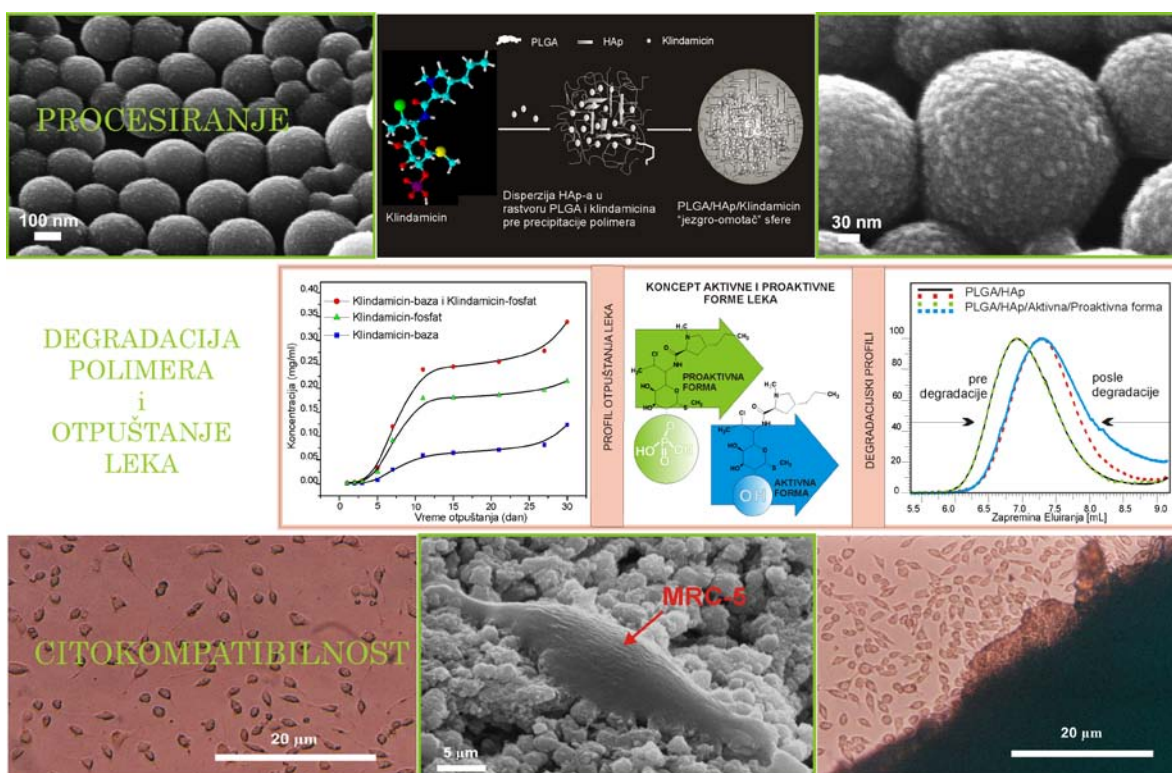
Poli( <i>D,L</i> -laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit kao nosač antibiotika .....	62
1.6. STRATEGIJA AKTIVNE I PROAKTIVNE FORME LEKA .....	63
1.6.1. <i>Osnovni princip</i> .....	64
1.6.2. <i>Aktivna i proaktivna forma klindamicina</i> .....	65
1.7. BIOKOMPATIBILNOST .....	68
1.7.1. <i>Doprinos površinskih karakteristika biokompatibilnosti materijala</i> .....	69
<b>CILJ RADA .....</b>	<b>72</b>
<b>EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	76
3.1.1. <i>Materijali za sintezu i procesiranje</i> .....	76
3.1.2. <i>Materijali za degradaciju polimera i otpuštanje leka</i> .....	76
3.1.3. <i>Materijali za in vitro testove citotoksičnosti</i> .....	76
3.1.4. <i>Ćelijske kulture</i> .....	77
<b>3.2. METODE</b> .....	77
3.2.1. <i>Metoda procesiranja kompozita i inkapsulacije leka</i> .....	77
3.2.1.1. <i>Obeležavanje fluorescentnim bojama</i> .....	79
3.2.2. <i>Metoda degradacije polimernog dela kompozita i otpuštanja leka</i> .....	81
3.2.3. <i>Metoda sterilizacije</i> .....	83
3.2.4. <i>Metode za analizu svojstava materijala</i> .....	84
3.2.5. <i>Metode za analizu procesa degradacije kompozita i otpuštanja leka</i> .....	89
3.2.6. <i>Metode za in vitro analizu citotoksičnosti materijala</i> .....	93
<b>REZULTATI .....</b>	<b>98</b>
<b>4.1. KARAKTERIZACIJA PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM</b> .....	99
4.1.1. <i>Optimizacija procesa inkapsulacije klindamicina u okviru PLGA/HAp kompozitnog materijala</i> ... 99	
4.1.1.1. <i>Inkapsulacija primenom organskog rastvarača/organskog nerastvarača polimera (O/O)</i> .....	99
4.1.1.2. <i>Inkapsulacija primenom organskog rastvarača/vodenog nerastvarača polimera (O/V)</i> .....	102
4.1.2. <i>Identifikacija inkapsuliranog klindamicina i određivanje efikasnosti inkapsulacije</i> .....	105

4.1.3. Morfološke karakteristike PLGA/HAp kompozitnog materijala sa različitim sadržajem klindamicina.....	111
4.1.4. Morfološke karakteristike PLGA/HAp kompozita, PLGA i HAp-a sa klindamicinom .....	113
4.1.5. Površinske karakteristike materijala sa inkapsuliranim klindamicinom .....	116
<b>4.2. ANALIZA PROCESA DEGRADACIJE PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM I OTPUŠTANJA LEKA</b> .....	<b>122</b>
4.2.1. Analiza otpuštanja klindamicina iz PLGA/HAp kompozitnog materijala i sa površine HAp-a.....	122
4.2.2. Morfološke promene PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom u toku procesa degradacije .....	124
4.2.3. Strukturne promene PLGA/HAp kompozita u toku procesa degradacije .....	128
4.2.4. Promene molarnih masa PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom u toku procesa degradacije .....	130
4.2.5. Termičke osobine PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom u toku procesa degradacije .....	132
4.2.6. Površinske karakteristike PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom u toku procesa degradacije .....	134
<b>4.3. IN VITRO CITOTOKSIČNOST PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM</b> .....	<b>137</b>
4.3.1. Kvantifikacija stepena citotoksičnosti PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom	138
4.3.2. Morfološka analiza ćelija inkubiranih u prisustvu PLGA/HAp kompozita sa različitim sadržajem klindamicina.....	141
4.3.3. Morfološke karakteristike ćelija adheriranih za površinu PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom.....	144
<b>DISKUSIJA</b> .....	<b>146</b>
<b>5.1. INKAPSULACIJA KLINDAMICINA U PLGA/HAP KOMPOZITNI MATERIJAL PRIMENOM METODE ULTRAZVUČNOG PROCESIRANJA I KARAKTERISTIKE MATERIJALA</b> .....	<b>147</b>
5.1.1. Princip inkapsulacije klindamicina u okviru PLGA/HAp biokompozita .....	147
5.1.2. „Jezgro-omotač“ struktura PLGA/HAp-a sa inkapsuliranim klindamicinom .....	150
<b>5.2. DEGRADACIJA PLGA/HAP MATERIJALA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM I PROCES OTPUŠTANJA LEKA</b> .....	<b>154</b>
5.2.1. Kontrolisano otpuštanje aktivnih komponenti iz PLGA/HAp-a.....	154
5.2.2. Degradacijski profil polimernog dela PLGA/HAp kompozita.....	155
5.2.3. Degradacija PLGA/HAp-a nasuprot simultanog otpuštanja leka.....	159

<b>5.3. CITOKOMPATIBILNOST I POVRŠINSKE KARAKTERISTIKE PLGA/HAP MATERIJALA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM</b> .....	160
<b>ZAKLJUČCI</b> .....	164
<b>SADRŽAJ SLIKA</b> .....	169
<b>SADRŽAJ TABELA</b> .....	174
<b>LITERATURA</b> .....	175
<b>BIBLIOGRAFIJA</b> .....	196



# GRAFIČKI IZVOD



**Slika 1:** Poli(D,L-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit/klindamicin: procesiranje kompozita, degradacija polimera, otpuštanje leka i citokompatibilnost.

## IZVOD

---

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjen je novi koncept inkapsulacije aktivne i proaktivne forme leka u okviru nosača koji bi bio u mogućnosti da kontroliše proces njihovog lokalnog otpuštanja u toku dužeg vremenskog perioda. Cilj formiranja ovakvog sistema su produžetak perioda lokalnog otpuštanja antibiotika i veći stepen kontrole nad njegovom koncentracijom. To su uslovi koji su neophodni za unapređenje tretmana hroničnih infekcija koštanog tkiva.

Poli(*D,L*-laktid-*ko*-glikolid)/hidroksiapatit (PLGA/HAp) kompozitni materijal, izgrađen iz „jezgro-omotač“ nanostruktura, primenjen je kao nosač klindamicin-baze kao modela aktivne i klindamicin-2-fosfata kao modela proaktivne forme leka. Polimerni omotač, izgrađen iz nanosfernih primarnih čestica dijametra do 20 nm, ima ulogu matrice u okviru koje je dispergovan jedan deo leka. Biokeramičko jezgro je izgrađeno iz štapićastih čestica HAp-a na čijoj je površini, na granici između polimera i keramike, adsorbovan preostali deo leka.

Optimizacijom uslova za procesiranje PLGA/HAp materijala i inkapsulaciju leka utvrđeno je da koncentracija leka i priroda izabranog sistema rastvarač/nerastvarač polimera, značajno utiču kako na morfološke karakteristike (oblik i veličinu) čestica PLGA/HAp-a tako i na efikasnost procesa inkapsulacije. Sa povećanjem koncentracije leka i sa povećanjem njegove rastvorljivosti u sistemu rastvarač/nerastvarač polimera postižu se veća pravilnost morfologije čestica i veći stepen inkapsulacije.

Tokom procesa degradacije kompozita postiže se kontrolisano otpuštanje proaktivne (fosfatne) forme leka, koju odlikuje bolja rastvorljivost u vodi, i odloženo otpuštanje aktivne (bazne) forme leka, čija je rastvorljivost u vodi slabija. Rezultat toga je visoka koncentracija ukupno otpuštenog leka u toku perioda od 30 dana u *in vitro* uslovima. U toku ovog procesa dešavaju se promene morfoloških, strukturnih, makromolekulskih i površinskih karakteristika nosača leka. Njihova promena zavisi od prirode inkapsuliranog leka čija interakcija sa nosačem utiče na kinetiku njegove degradacije.

Važnost prisustva HAp-a, kao biokeramičke faze u okviru PLGA/HAp-a, pripisana je kako usporavanju procesa degradacije polimera tako i unapređenju površinskih karakteristika kompozita. Porast specifične površine i unapređena kvašljivost materijala ukazuju na mogućnost njegove dobre interakcije sa ćelijama. Ove osobine su blisko povezane sa bioaktivnošću i biokompatibilnošću ovog materijala za koji je u toku *in vitro* testova utvrđen visok stepen citokompatibilnosti i netoksičnosti.

Na osnovu postignute kinetike otpuštanja leka kao i izuzetno dobre citokompatibilnosti može se zaključiti da formirani materijal pokazuje dobar potencijal za primenu u biomedicini kao nosač koji, nakon lokalne primene, lek dostavlja direktno na mesto infekcije uz minimalizaciju ili eliminaciju efekata koje uzrokuje tip dostave kod koga se lek distribuira u celom organizmu. To je pristup od koga se očekuje efikasnije lečenje infekcija koštanog tkiva i eliminacija neželjenih efekata.

## *ABSTRACT*

---

In this doctoral dissertation a new concept of encapsulation of active and proactive drug forms within a carrier which will be able to provide a control over the process of their local release during extended period of time is applied. The goal of formation of such a system is prolongation of the period of local release of antibiotic and higher control over its concentration. These are conditions which are required for improvement of the treatment of chronic bone tissue infections.

Poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide)/hydroxyapatite (PLGA/HAp) composite material, built of core-shell nanostructures, was applied as a carrier of clindamycin-base, as a model of active drug form, and clindamycin-phosphate, as a model of proactive drug form. Polymeric shells consisting of small nanospheres up to 20 nm in size act as a matrix in which one part of the drug is dispersed. Ceramic cores are formed of rod-like hydroxyapatite particles at the surface of which another part of the drug is adsorbed- into the interface between polymer and ceramics.

During the optimization of the conditions for processing of PLGA/HAp material and encapsulation of the drug it was observed that concentration of the drug as well as the nature of selected polymer solvent/nonsolvent system, significantly influence morphological properties of PLGA/HAp particles and efficacy of encapsulation process. With increase of the concentration of the drug and increase of the solubility of the drug within solvent/nonsolvent system, more regular morphology and higher encapsulation degree are obtained.

During the process of degradation of the composite controlled release of the more soluble proactive (phosphate) form and the sustained release of the less-soluble active (base) form of clindamycin are achieved, resulting in a high overall concentration of released drug during a period of 30 days *in vitro*. During this process morphological, structural, macromolecular and surface changes occurred. Their change depends on the nature of encapsulated drug that interacts with the drug carrier influencing the kinetics of composite degradation.

Importance of the HAp, as bioceramic phase within the PLGA/HAp, is assigned to delay of the process of polymer degradation and to improvement of the surface properties of drug carrier. Increase of the surface area and improved wettability of prepared composite suggests possibility for its good interaction with cells. These properties are closely related to bioactivity and biocompatibility of this material for which *in vitro* tests showed high level of cytocompatibility and non-toxicity.

On the basis of obtained kinetics of drug release as well as very good cytocompatibility it can be concluded that formed material shows high potential for the application in biomedicine as a locally applied carrier of drug able to deliver drug directly to the place of infection with minimization or elimination of effect developed by types of delivery in which the drug is distributed in the whole organism. It is expected that this approach will be able to provide more efficient treatment of bone tissue infections and elimination of side effects.

# TEORIJSKI DEO

---

**I**

## 1.1. UVOD

---

Glavni cilj savremene medicine je rana i tačna dijagnostika poremećaja u organizmu praćena preciznom i efikasnom terapijom sa minimalizovanim sekundarnim efektima. Za tu namenu dugi niz godina istražuju se načini za unapređenje dijagnostičkih i terapijskih strategija. Upravo ta istraživanja omogućila su razvoj biomaterijala- materijala primenljivih u živom organizmu.<sup>[1]</sup>

Bionanotehnologija je razvijena kao posebna disciplina u okviru nanotehnologija koja se bavi razvojem materijala za biološku aplikaciju. Ova disciplina je orijentisana ka usavršavanju osnovnih karakteristika materijala, kao što su sastav, struktura i morfologija, u cilju postizanja optimalnih svojstava pogodnih za primenu u živom organizmu. Ova tehnologija omogućava kontrolu veličina čestica u cilju postizanja nanočestičnih ili nanostrukturnih materijala.<sup>[2]</sup> Fizičko-hemijska svojstva materijala koji sadrže nanočestice su promenjena u odnosu na svojstva koja ima materijal istog hemijskog sastava izgrađen iz čestica većih dimenzija. Kod nanostrukturiranih biomaterijala važna je činjenica da su njihove dimenzije uporedive sa veličinom ćelijskih komponenti, proteina, nukleinskih kiselina, virusa, što pruža mogućnost njihove međusobne interakcije na molekulskom nivou.<sup>[3]</sup>

Nanostrukturni biomaterijali se dugi niz godina primenjuju u različitim oblastima medicine.<sup>[4]</sup> Neke od njihovih primena odnose se na izradu kontrastnih agenasa,<sup>[5]</sup> biomarkera<sup>[6]</sup> i biosenzora<sup>[7]</sup> koji imaju dijagnostička svojstva, kao i u regenerativnoj, rekonstruktivnoj i plastičnoj hirurgiji za izgradnju implantata (kostiju, mišića, nerava, sočiva, krvnih sudova itd.)<sup>[8],[9]</sup> i farmaciji (dostava medikamenata i gena)<sup>[10],[11]</sup> u kojima oni imaju terapijsku funkciju. Kada je reč o doziranju medikamenata, primena različitih biomaterijala kao nosača lekova omogućila je razvoj vremenski kontrolisanog doziranja lekova.<sup>[11]</sup>

U okviru razvoja biomaterijala na Institutu tehničkih nauka SANU u Beogradu, rađena su istraživanja vezana za: metode sinteze i procesiranja polimernih (poli(*D,L*-laktid-*ko*-glikolid) (PLGA), <sup>[12],[13]</sup> poli(*L*-laktid) (PLLA)), biokeramičkih (HAp) <sup>[14]</sup> i kompozitnih biomaterijala (PLGA/HAp) <sup>[15],[16]</sup>, potencijalnu primenu kompozitnih biomaterijala u rekonstrukciji i

reparaciji koštanog tkiva,<sup>[17],[18]</sup> kao i razvoj metoda inkapsulacije za izradu materijala primenljivih u kontrolisanoj dostavi medikamenata kao nosača medicinski aktivnih komponenti (vitamina rastvorljivih u vodi i u ulju,<sup>[19],[20],[21]</sup> proteina<sup>[22]</sup> i antibiotika<sup>[23],[24]</sup>).

Primenom metode sonohemijske sinteze i ultrazvučnog procesiranja sintetisan je hidroksiapatit i formiran njegov kompozit sa PLGA polimerom (PLGA/HAp).<sup>[15],[16],[25]</sup> U magistarskom radu koji obuhvata procesiranje i karakterizaciju ovog materijala navedeno je da su postignuta pravilnost morfologije i nanometarska veličina čestica ovog kompozita od značaja za njegovu potencijalnu primenu u biomedicinskom inženjerstvu- u formiranju višeslojnog biomaterijala ili kao nosača medikamenta. Obzirom na veliku slobodnu površinu i posledično veliku adhezivnost PLGA/HAp sfernih nano-čestica, ovaj materijal bi mogao da se primeni za izgradnju višeslojnog biomaterijala sa znatno unapređenim funkcionalnim osobinama. U skladu sa tim on bi, uz pretpostavljeno poboljšanje i drugih osobina koje zavise od morfologije, bio dobar kandidat kao materijal za primenu u rekonstruktivnoj medicini. Sa druge strane, veliki udeo polimerne komponente (PLGA:HAp=90:10) povlači sa sobom i veliki kapacitet za inkapsulaciju leka što otvara mogućnost primene ovog materijala za izradu biodegradabilnih implantata-nosača medikamenata koji se ugrađuju unutar namenski formiranih malih koštanih defekata i na taj način otpuštaju lek bez protoka kroz krvotok i opasnosti od smanjenja prohodnosti krvnih sudova.<sup>[26]</sup>

Nastavak rada na PLGA/HAp kompozitnom materijalu, koji je tema ove doktorske disertacije, razmatra primenu ovog materijala sa stanovišta nosača leka. Metoda procesiranja PLGA/HAp kompozita primenom ultrazvučnog polja optimizovana je za inkapsulaciju antibiotika, analizirana su svojstva materijala sa inkapsuliranim lekom (morfološka, strukturna, termička i makromolekulska), promena ovih svojstava u toku procesa degradacije polimernog dela kompozita, kinetika procesa otpuštanja leka kao i citokompatibilnost materijala u *in vitro* uslovima.

---

## 1.2. SAVREMENI SISTEMI ZA DOSTAVU MEDIKAMENATA

---

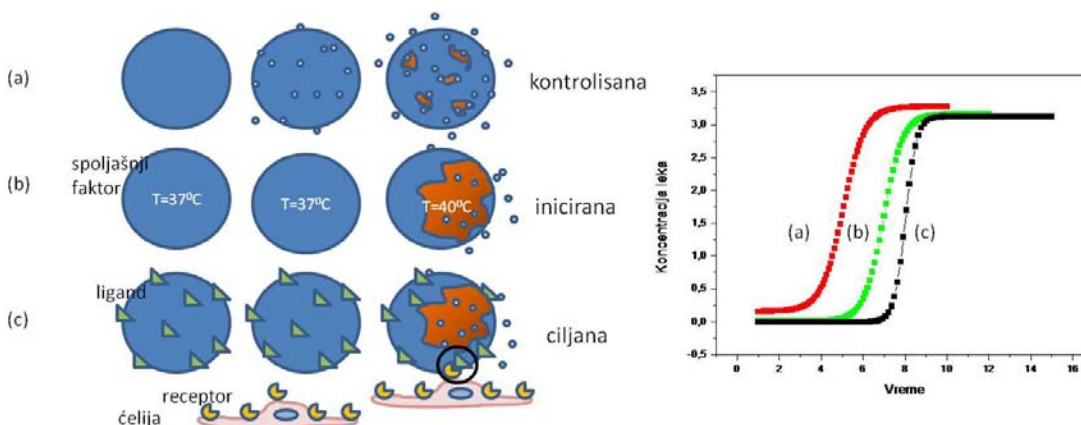
Nasuprot tradicionalnom načinu lečenja, koji je još uvek i najzastupljeniji u praksi, u toku poslednjih par decenija razvija se daleko napredniji sistem dostave lekova koji se bazira na primeni nosača medicinski aktivnih supstanci. Visok stepen sofisticiranosti ovog novog



pristupa lečenju zasniva se na izuzetnoj manipulativnosti. Mesto otpuštanja leka, momenat početka njegovog otpuštanja, vremenski interval u toku kog će se otpuštati kao i količina leka koja će u toku vremena biti otpuštena najviše zavise od osobina nosača. Preciznim dizajniranjem njegovih osobina pruža se mogućnost za prilagođavanje dostave leka specifičnim potrebama pojedinačnih vrsta terapijskih, dijagnostičkih ili preventivskih potreba.<sup>[27],[28]</sup> Na taj način se postižu povećanje preciznosti i kontrole lečenja što posledično omogućava unapređenje efikasnosti, skraćuje vreme medikacije i potencijalno ublažava ili potpuno uklanja pojavu neželjenih efekata.

Dostava lekova primenom nosača razvijena je u nekoliko osnovnih pravaca koji su grafički predstavljeni na slici 1.1 i mogu se podeliti na:

- (a) Kontrolisanu dostavu medikamenata
- (b) Odloženu (iniciranu) dostavu medikamenata
- (c) Ciljanu dostavu medikamenata.



**Slika 1.1.** Ilustracija tipova dostave medikamenata primenom nosača.

**Kontrolisana dostava.** Osnovna karakteristika kontrolisane dostave medikamenata (Slika 1.1a) je zavisnost kinetike otpuštanja leka od postepene promene svojstava koja su specifična za primenjeni nosač - poput degradacije biodegradabilnih polimera u fiziološkim uslovima.<sup>[29]</sup> Odabrano svojstvo materijala, čija postepena promena kontroliše otpuštanje leka, ima mogućnost kontrole nad količinom leka koji će biti otpušten kao i nad vremenskim intervalom u toku kog će se lek otpuštati. U okviru kontrolisane dostave lekova neophodno je pomenuti lokalnu dostavu koja je njen specifični slučaj. Princip dostave leka je identičan prethodno

opisanom sa tom razlikom da je nosač zajedno sa inkapsuliranim lekom lokalno implantiran na mestu na kom je predviđeno njegovo dejstvo.<sup>[30]</sup> Jedan od primera primene implantata-nosača lekova je lokalna intramuskularna dostava antidijabetika.<sup>[31]</sup>

**Odložena ili inicirana dostava.** Ovu vrstu dostave medikamenata (Slika 1.1b) odlikuje programiranost momenta u kome će otpuštanje leka započeti. Za ovaj vid dostave koriste se nosači medikamenata koji poseduju mogućnost promene određenog svojstva pod uticajem varijacije spoljašnjih parametara kao što su temperatura, kiselost ili koncentracija određenog agensa. U momentu kada nastupi promena nekog od parametara karakterističnih za patološko stanje okruženja, svojstva materijala-nosača se menjaju što omogućava otpuštanje leka. Za ovu namenu najčešće se primenjuju namenski konstruisane strukture polimera koje imaju sposobnost promene stanja pod uticajem navedenih parametara okruženja. Primer je prelaz iz tubularne u planarnu strukturu polimera koji može biti iniciran odstupanjem od prosečne temperature živog organizma kada počinje otpuštanje leka.<sup>[32]</sup>

**Ciljana dostava.** U slučaju ciljane dostave medikamenata (Slika 1.1c) nosač, koji se u ovom slučaju naziva i vektorom, se kreće ka mestu na kome lek treba da ispolji svoje dejstvo. To podrazumeva da se ovim pristupom dostavi lekova postiže kontrola nad mestom na kom će lek biti oslobođen. Način na koji je ova vrsta kontrole nad nosačem leka postignuta najčešće se odnosi na preciznu modifikaciju površinskih karakteristika nosača koja podrazumeva vezivanje liganada sposobnih da se specifično vežu za odgovarajuću, ciljanu grupu receptora.<sup>[33]</sup> Alternativni način usmeravanja nosača sa lekom ka ciljanom mestu odnosi se na mogućnost manipulacije primenom spoljašnjeg polja (električnog, magnetnog, ultrazvučnog, itd). U tom slučaju vektor mora posedovati karakteristike koje ga čine osetljivim na spoljašnje uticaje kako bi se postiglo njegovo kretanje kao i mogućnost vizuelizacije koja olakšava njegovo usmeravanje.<sup>[34]</sup> Ovaj način dostave medikamenata trenutno privlači dosta pažnje upravo zbog mogućnosti manipulacije na ćelijskom ili subćelijskom nivou. Na taj način se postiže veća specifičnost lečenja. Povećana specifičnost lečenja je naročito važna u slučaju primene antibiotika<sup>[33]</sup> i antikanceroznih<sup>[35],[36],[37]</sup> medikamenata.

Danas postoji izuzetno veliki broj različitih nosača lekova razvijenih u skladu sa potrebama potencijalne aplikacije. Njihovo konstantno usavršavanje prati uzlazni trend broja zahteva

kojima se definiše pogodnost savremenog materijala za biomedicinsku primenu. Generalno, do sada razvijeni nosači lekova koji mogu se podeliti u tri grupe:

(a) *Sintetski (polimeri, neorganske nanočestice, kompoziti, itd.)*

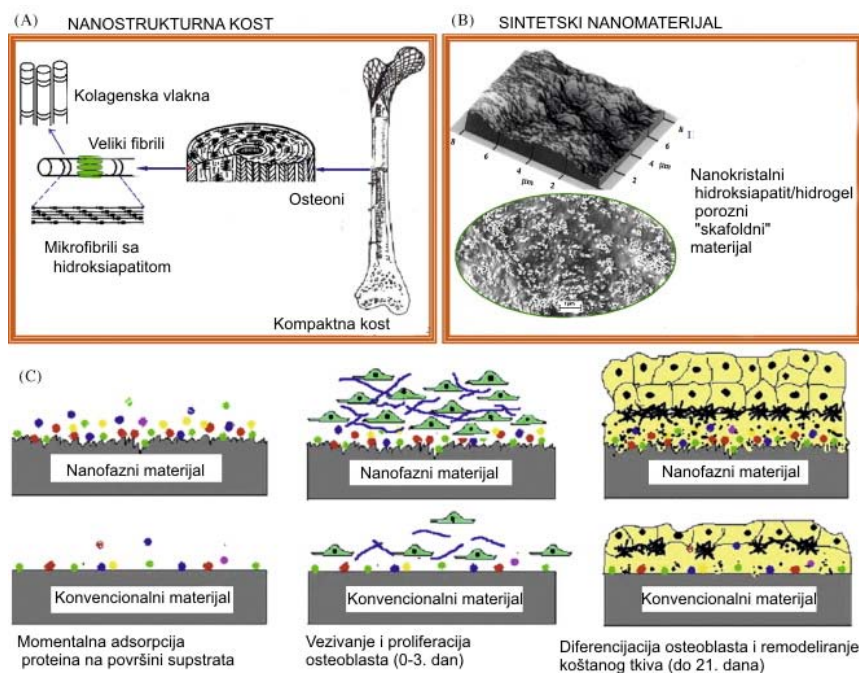
(b) *Prirodni (proteini, peptidi, enzimi, itd.)*

(c) *Ćelijski nosači (makrofagi, eritrociti, bakterije, virusi, itd.)*

### **Sintetski nosači lekova**

Od otkrića mogućnosti vremenski kontrolisane difuzije molekula leka (koji odlikuje hidrofobnost i mala molekulska masa) kroz silikonski nosač 1964. godine, polimerni materijali zauzimaju izuzetno važno mesto u dostavi medikamenata.<sup>[38]</sup> Oni pripadaju grupi materijala sa kojim je ovaj način dostave lekova započet, kao i najvećem delu savremenih materijala koji se danas intenzivno primenjuju i konstantno unapređuju u cilju formiranja naprednih nosača lekova. Velika zastupljenost polimera u dostavi lekova potiče upravo iz činjenice da oni pripadaju klasi materijala koju odlikuje gotovo neograničena promenljivost topologije i hemijskog sastava.<sup>[39]</sup>

Značajan doprinos kvalitetu sintetskih nosača lekova pružilo je usavršavanje nanotehnologija u okviru kojih je razvijeno polje nanomedicine.<sup>[40],[41]</sup> Širok spektar novih nanomaterijala koji uključuje polimerne čestice, liposome, kvantne tačke i metalne/metal-oksidne materijale razvijen je u cilju terapijskog i dijagnostičkog dostavljanja medicinski aktivnih supstanci.<sup>[42]</sup> Najveći značaj ove vrste materijala je u mogućnosti postizanja izrazito boljih karakteristika, kao što su citokompatibilnost, mehaničke, električne, optičke, katalitičke i magnetne, u poređenju sa tradicionalnim materijalima.<sup>[43]</sup> Nanotehnologija ima izuzetno važnu ulogu u procesu lečenja koštanog tkiva.<sup>[44]</sup> Na slici 1.2. prikazan je primer morfologije sintetskog, nanostrukturnog materijala za koštanu dostavu medikamenata u poređenju sa strukturom prirodnog koštanog tkiva, kao i izrazito bolja interakcija sa ćelijama u smislu brže adsorpcije proteina, vezivanja, proliferacije i diferencijacije osteoblasta kao i finalne regeneracije kosti u poređenju sa tradicionalnim materijalom.<sup>[43]</sup>

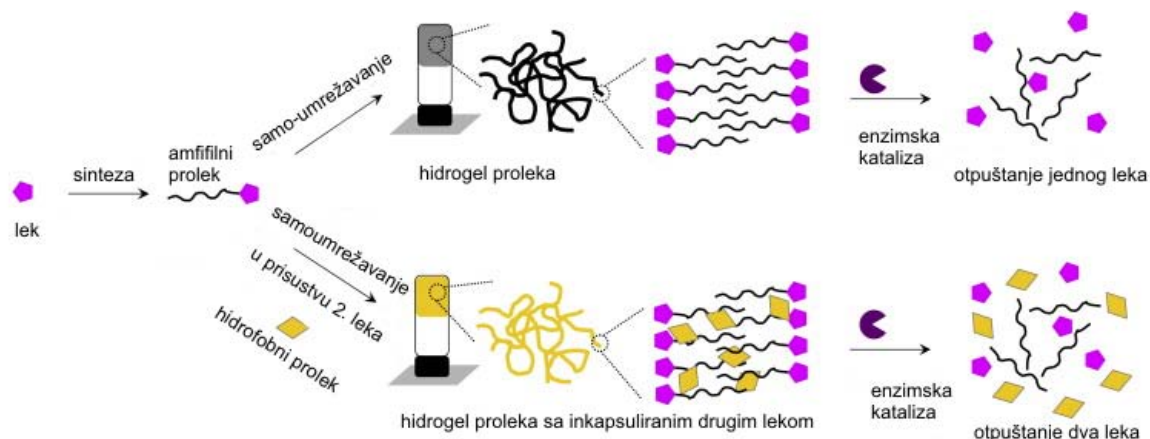


**Slika 1.2.** Ilustracija prednosti nanomaterijala u odnosu na konvencionalne na primeru hidroksiapatit/hidrogel nanokristalnog supstrata<sup>[43]</sup>

### Prirodni nosači lekova

Primena prirodnih materijala vezana je za upotrebu materijala po uzoru na biološke sisteme. Glavna prednost primene prirodnih materijala (proteina, enzima, peptida, itd.) kao nosača lekova je veoma dobra biokompatibilnost. Za razliku od sintetskih materijala koje treba posebno dizajnirati na taj način da se postigne što veći stepen podobnosti za primenu u živom organizmu, prirodni materijali su napravljeni prirodnim procesima što im obezbeđuje karakteristike koje su preduslov za dobru interakciju sa organizmom.<sup>[45]</sup> Ipak, treba uzeti u obzir činjenicu da procesi koji omogućavaju izolovanje iz prirodnih izvora ne obezbeđuju visok stepen čistoće ovih materijala zbog nedovoljno razvijenih biotehnoških metoda, kao i da proces njihovog prečišćavanja povlači sa sobom mogućnost promene nekih od karakteristika koje su prvobitno posedovali nakon sinteze u živom organizmu. Mogućnost promene ovih materijala vezana je takođe i za sam proces inkapsulacije leka.<sup>[46]</sup> Zahvaljujući dobro razvijenim površinskim karakteristikama ovi materijali se veoma često koriste za funkcionalizaciju sintetskog materijala,<sup>[47]</sup> za ciljanu dostavu lekova do specifičnog mesta<sup>[48]</sup> ili kao materijali koji iniciraju otpuštanje leka (u slučaju enzimski katalisane dostave

medikamentata)<sup>[49]</sup>. Enzimi pored mogućnosti da kontrolišu otpuštanje leka iz nosača imaju takođe i mogućnost njihove aktivacije, odnosno prevođenja iz neaktivne forme proleka u aktivnu formu leka. Na slici 1.3 ilustrovan je primer otpuštanja jednog kao i simultano otpuštanje dva leka koji su aktivirani enzimskom aktivnošću.<sup>[49]</sup>



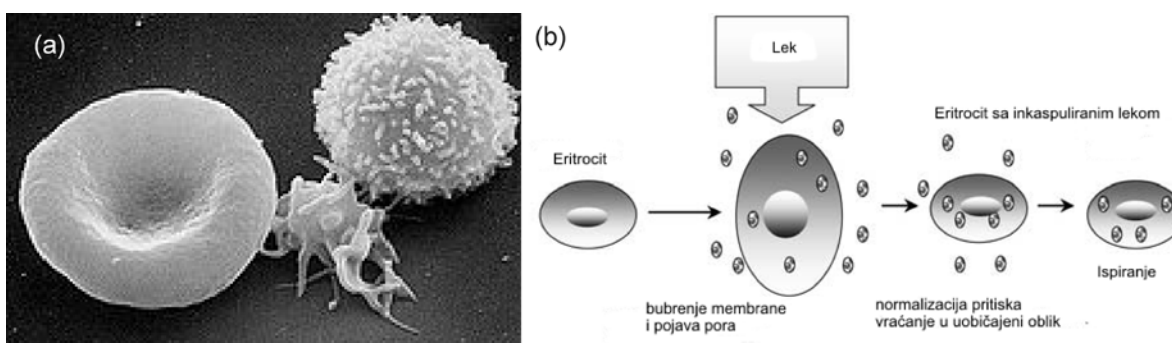
**Slika 1.3.** Ilustracija enzimski katalisanog otpuštanja leka<sup>[49]</sup>

### Ćelijski nosači lekova

Jedan od najsavremenijih načina dostave lekova koji se danas intenzivno istražuje odnosi se na primenu ćelija kao nosača lekova. Za tu namenu koriste se razne vrste ćelija, poput matičnih i ćelija krvnog tkiva, kao i jednoćelijski organizmi poput bakterija i virusa.

Kada je reč o ćelijskim nosačima lekova, za tu namenu se najčešće primenjuju eritrociti (crvena krvna zrnca).<sup>[50]</sup> Pored toga što su prirodni, sigurni i sposobni da prenesu veliku količinu leka, oni imaju mogućnost inkapsulacije enzima kada imaju ulogu bioreaktora. Tehnike inkapsulacije leka u okviru eritrocita su izuzetno jednostavne i baziraju se na hiposmotskoj dijalizi koja je ilustrovana na slici 1.4.<sup>[51]</sup> Selektivni transport do precizno definisanog organa ili tkiva, koji omogućavaju eritrociti, naročito je važan za dostavu aminoglikozidnih antibiotika, antikanceroznih lekova i sistematskih kortikosteroida. Izuzetno je značajna mogućnost formiranja takozvanih paramagnetnih eritrocita, koji se dobijaju inkapsulacijom kontrastnih agenasa, a koji imaju važnu funkciju u dijagnostici ranih stadijuma patoloških stanja.<sup>[52]</sup> Ćelijski nosači lekova, generalno, imaju veliku prednost u odnosu na sve do sada procesirane prirodne ili sintetske nosače u smislu istovremene prirodne biokompatibilnosti i funkcionalizacije. Ove osobine ćelijskim nosačima lekova omogućavaju

ulogu vektora sposobnih da nesmetano prođu kroz sve biološke membrane (anatomske, fiziološke, fagocitne ili inflamatorne), nemaju mogućnost aglomeracije i promene morfoloških i površinskih karakteristika u fiziološkim uslovima, otporni su na metaboličke procese i sposobni su da slobodno putuju kroz krvotok do tačno definisanog mesta u organizmu na kom lek treba da ispolji svoje dejstvo. Sa druge strane, i pored navedenih osobina ove vrste nosača, njihova primena u humanoj medicini je izuzetno ograničena. Glavni problemi koji sprečavaju njihovu širu upotrebu prvenstveno se odnose na nemogućnost adekvatnog skladištenja, izrazitu sposobnost kontaminacije i odsustvo validiranih industrijskih procedura za njihovo procesiranje u vidu leka. [50]



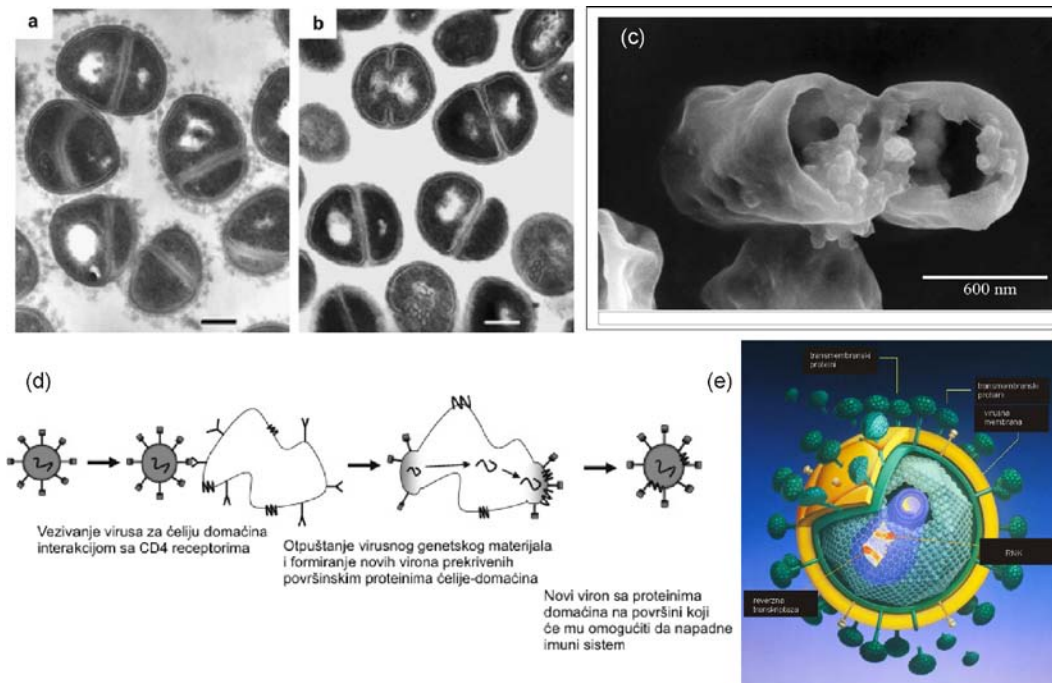
**Slika 1.4.** Morfologija humanog eritrocita (a); ilustracija hipo-osmotske dijalize- metode za inkapsulaciju leka unutar eritrocita (b). [51]

Bakterije i virusi su mikroorganizmi koje odlikuje izuzetna sposobnost prilagođavanja u organizmu u cilju borbe protiv imunološkog sistema i sopstvenog opstanka i razmnožavanja. Za tu svrhu, ovi mikroorganizmi prvenstveno koriste svoje površinske karakteristike. [53]

U slučaju bakterija jedan vid sistema zaštite od imunog sistema podrazumeva građenje površinske kapsule (na slikama 1.5 a i b date su TEM mikrofografije koje pokazuje prisustvo i odsustvo kapsule oko bakterija iz grupe *Staphylococcus*) [53], koja sadrži polisaharidne makromolekule koji maskiraju bakterijske površinske proteine. Unutrašnjost bakterija ima dosta kapaciteta za inkapsulaciju leka (na slici 1.5.c SEM mikrofografija pokazuje morfologiju spoljašnje i unutrašnje strane bakterije *Escherihia Coli*) [54]. Kako humani gastrointestinalni trakt sadrži preko 400 vrsta bakterijskih vrsta koje grade njegovu prirodnu floru, prvi i najrazvijeniji način primene bakterija u dostavi lekova odnosio se na upotrebu crevnih bakterija kao inicijatora postepenog otpuštanja lekova za lečenje bolesti crevnih



infekcija<sup>[55],[56]</sup>. Kasnije je ustanovljeno da se veliki broj drugih bakterija koje ne uspostavljaju parazitski način života u organizmu i ne izazivaju patološka stanja mogu koristiti kao nosači različitih agenasa kao što su antigeni i nukleinske kiseline što je od izuzetnog značaja za dostavu vakcina. <sup>[54]</sup>



**Slika 1.5.** TEM mikrografije *Staphylococcus Haemolyticus* bakterije (a,b), SEM mikrografija bakterije *Escherichia Coli* (c); ilustracija mehanizma delovanja (d) i strukture HIV virusa (e).<sup>[53],[54]</sup>

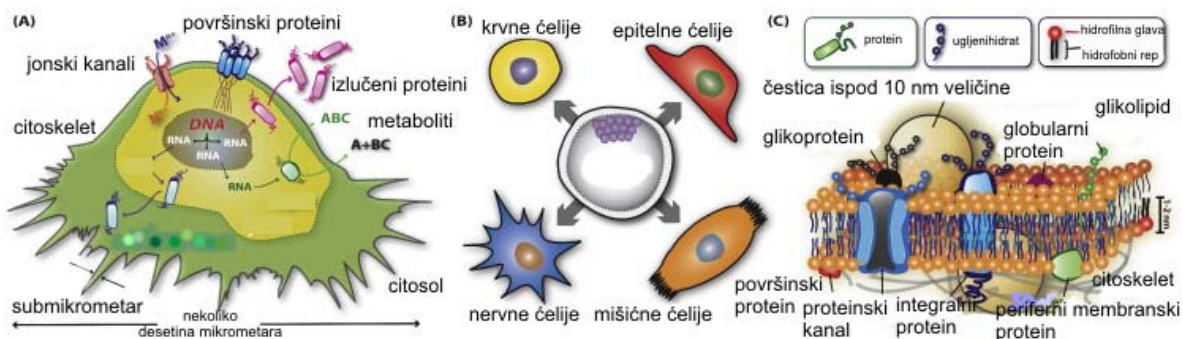
Kada je reč o virusima, njihov mehanizam zaštite od imunog sistema kao i mehanizam dejstva su daleko sofisticiraniji u poređenju sa bakterijama sa tom sličnošću da i oni za tu namenu koriste svoje površinske karakteristike. Na slikama 1.5.d i e ilustrovani su mehanizam dejstva i struktura HIV virusa.<sup>[53]</sup> Ovaj virus sadrži površinske grupe koje mu omogućavaju vezivanje za površinu ćelije nakon čega u nju unosi svoj genetski materijal. Uneti genetski materijal reprogramira ćeliju koja počinje da proizvodi virione identične početnom virusu, ali sa sopstvenim proteinima na površini. Tako formirani virioni imaju sposobnost da budu maskirani i da se kao takvi bore protiv imunog sistema izazivajući imunološki deficit. Osnovna ideja primene virusa u dostavi lekova zasniva se na njihovog genetskoj modifikaciji nakon koje bi se iskorišćenjem mehanizma njihovog prirodnog dejstva postigla dostava

željenog genetskog materijala do patološki modificiranih ćelija što bi ih konvertovalo u zdrave ćelije. Kandidati koji bi bili potencijalno primenjeni za ovaj način dostave medikamenata su retrovirusi (HIV, npr.), adenovirusi i *Herpes Simplex* virus. Najveće ograničenje predstavlja opasnost od njihove mutacije.<sup>[57]</sup>

### 1.3. MULTIFUNKCIONALNI SISTEMI

Biološki izvori primenjeni kao nosači lekova teorijski imaju najveće predispozicije da budu razvijeni u idealne nosače medikamenata. Ipak, obzirom na veoma ozbiljne negativne strane ovakvog pristupa koje se prvenstveno odnose na potencijalnu toksičnost i patogenost, najnoviji pravac razvoja nosača lekova odnosi se na formiranje materijala sa karakteristikama po ugledu na prirodne. Iz te ideje razvijen je koncept o formiranju „sintetske ćelije“.<sup>[58]</sup> Realizacija ovog koncepta je danas daleko od ispunjenja ali brojna istraživanja pokazuju priličan napredak u tom pravcu.<sup>[59]</sup> Poređenjem karakteristika bioloških sistema koji su potencijalni nosači lekova dolazi se do toga da im je zajednička osobina multifunktionalnost.

Ćelija, kao gradivna jedinica živih organizama je izgrađena iz pet osnovnih komponenti: (i) ćelijske membrane, (ii) receptora/proteina/metabolita, (iii) citoskeleta, (iv) citosola i (v) ćelijskog jedra (slika 1.6.). Svaka od ovih komponenti je multifunktionalni sistem za sebe i obavlja niz podfunkcija koje joj omogućavaju odvijanje glavne funkcije. Sve funkcije i podfunkcije su međusobno izuzetno sinhronizovane omogućavajući odvijanje životnog ciklusa.<sup>[27]</sup>



**Slika 1.6.** (a) Sastav ćelije sisara; (b) morfološke karakteristike različitih tipova ćelija; (c) građa ćelijske membrane.<sup>[27]</sup>

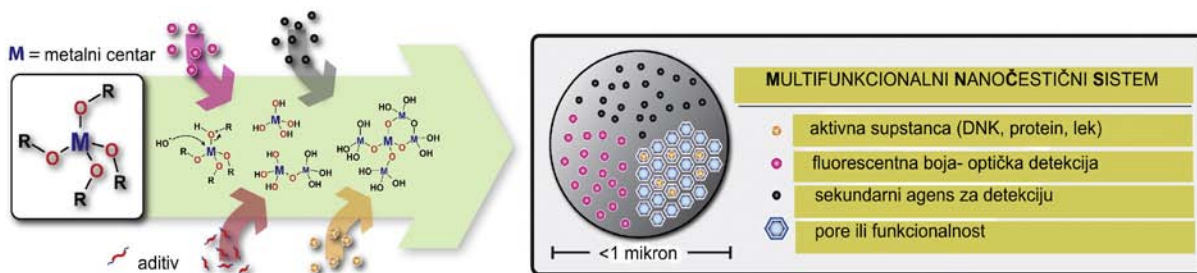


Po ugledu na biološke, današnji razvoj sintetskih materijala teži obezbeđivanju njihove višestruke uloge u organizmu. U dizajniranju novih materijala kao nosača lekova teži se formiranju multikomponentnih sistema čije bi podfunkcije, karakteristične za svaku komponentu, bile u mogućnosti da obezbede efikasno proširenje funkcionalnosti finalnog materijala. Najosnovniji tip bifunkcionalnog nosača leka najčešće je formiran na taj način da obezbedi dve osnovne funkcije: (1) postepeno otpuštanje leka i (2) eliminaciju matrice koja gradi nosač leka nakon što je period njegove dostave završen.<sup>[60]</sup> Formiranje multifunkcionalnog nosača leka podrazumeva kombinovanje različitih funkcija kao što su kontrolisana promena matrice nosača (degradacija, bubrenje), kontrola nad kinetikom otpuštanja leka (postepeno, inicirano i ciljano otpuštanje), eliminacija nosača leka, regeneracija mesta na kom je nosač bio implantiran kao i tkiva koje je nakon medikacije ostalo oštećeno usled prisustva patološkog stanja. Na ovaj način pruža se mogućnost za formiranje nove vrste sistema za dostavu lekova čija lokalna aplikacija može biti izuzetno efikasna u prevazilaženju poteškoća vezanih za nizak stepen dostupnosti leka na mestu na kome on treba da ispolji svoje dejstvo i pojave neželjenih efekata usled njegovog nagomilavanja u regionima u kojima njegovo prisustvo nije predviđeno.<sup>[61]</sup> U tom procesu najvažnija su tri aspekta:

- (1) *Vrsta materijala*: formiranje kompozita ili hibridnih organskih, neorganskih i/ili bioloških materijala.
- (2) *Morfologija i struktura*: formiranje submikronskih, nanostrukturnih ili nanometarskih materijala koji imaju dovoljno male dimenzije da mogu nesmetano da se uključe u funkcije koje se odvijaju na ćelijskom nivou i interaguju direktno sa biomolekulima.
- (3) *Površinske karakteristike*: obezbeđivanje odgovarajuće kvašljivosti, površinskog naelektrisanje, velike kontaktne površine i specifične površinske hemije koji su ključni faktori u formiranju efikasne i dinamične materijal-ćelija (nano-bio) kontaktne međupovršine.<sup>[27]</sup>

### 1.3.1. MATERIJALI ZA FORMIRANJE MULTIFUNKCIONALNIH SISTEMA

Multifunkcionalni nosači lekova podrazumevaju lipozome, micle, nanoemulzije, polimerne čestice i mnoge druge formulacije nosača lekova koje su dizajnirane na specifičan način tako da povezuju više različitih mogućih aktivnosti u zavisnosti od potreba buduće namene za koju su procesirani. [61] Na slici 1.7. predstavljena je opšta shema koja ilustruje formiranje multifunkcionalnog nanočestičnog sistema i potencijalne karakteristike koje on može imati. [27]



**Slika 1.7.** Ilustracija formiranja multifunkcionalnog nanočestičnog sistema. [27]

U toku formiranja ovakvih sistema primenjuje se više komponenti:

- Matrica* koja može da obezbedi inkapsulaciju dodatnih komponenti- aktivnih supstanci (DNK, proteina, lekova i sl.).
- Fluorescentna boja* koja pruža mogućnost optičke detekcije nosača što olakšava njegovu karakterizaciju nakon procesiranja kao i mogućnost praćenja procesa koji se dešavaju u toku otpuštanja medikamenta.
- Sekundarni agens za detekciju* koji je najčešće magnetna supstanca ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  npr.) sa funkcijom kontrastnog agensa za detekciju pomoću magnetne rezonance.
- Površinske pore i funkcionalne grupe* koje omogućavaju interakciju nanočestičnog sistema sa okruženjem. Pore su od velikog značaja zbog sposobnosti ćelija da se vezuju za reljefne površine (koje imaju veću specifičnu površinu), dok posebne funkcionalne grupe obezbeđuju adekvatno naelektrisanje, kvašljivost kao i vezivanje za posebnu

vrstu receptora što je od velikog interesa za ciljanu dostavu. U specijalnim slučajevima agens funkcionalizacije može služiti i za usmeravanje nosača leka ka specifičnom mestu ili kao biosenzor.<sup>[27]</sup>

### **Matrica**

Polimeri predstavljaju univerzalni sistem za inkapsulaciju.<sup>[62]</sup> Matrica u okviru koje se inkapsuliraju ostale komponente i čija se površina funkcionalizuje prilikom formiranja multifunkcionalnog sistema najčešće je izgrađena iz biodegradabilnih organskih polimera kao što je PLGA<sup>[63]</sup> ili iz neorganskih materijala kao što su metalni oksidi (silika)<sup>[64]</sup>. Prilikom izbora matričnog sistema koji nosi glavnu ulogu u procesu transporta i otpuštanja medikamenta neophodno je prilagoditi izbor materijala koji se koristi za ovu namenu kako svojstvima leka koji se transportuje tako i specifičnim potrebama tretmana određenog patološkog stanja koje se na ovaj način leči (adekvatan način otpuštanja leka).

### **Fluorescentne boje**

Obeležavanje nosača lekova je od velikog značaja za njegovu karakterizaciju kao i za prećenje u toku *in vitro* i *in vivo* analiza. Za tu namenu koriste se čestice boje inkapsulirane u okviru nosača (u vidu kompozita) kao i boje koje su hemijski vezane i/ili fizički adsorbovane za matricu nosača leka. Neke od boja koje se najčešće koriste su boje koje poseduju organske fluorofore (fluorescein, rodamin)<sup>[61], [64]</sup> ili kvantne tačke (CdTe, HgTe).<sup>[65]</sup>

### **Sekundarni agens za detekciju**

Kao što je već rečeno, sekundarni agens za detekciju najčešće služi kao kontrastni agens za magnetnu rezonancu. Površinska funkcionalizacija ili inkapsulacija ovog agensa je takođe sposobna da obezbedi osetljivost nosača na spoljašnje uticaje (magnetno ili ultrazvučno polje, temperaturu, pH ili redoks potencijal). Na ovaj način se omogućava ne samo njegova detekcija već i kontrola nad mobilnošću nakon unošenja u organizam i/ili kontrola nad otpuštanjem inkapsuliranog medikamenta.<sup>[66]</sup> Sistemi osetljivi na magnetno polje najčešće imaju inkapsulirane ili površinski vezane nanočestice hematita (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) čijim se osciliranjem u spoljašnjem magnetnom polju lokalno zagreva nosač i na taj način se utiče na kinetiku otpuštanja leka.<sup>[67]</sup> Sličan mehanizam postoji i u slučaju ultrazvučno osetljivih agenasa, poput lipozoma.<sup>[68]</sup> Pored mogućnosti za otpuštanje leka pod uticajem lokalnog dejstva ultrazvuka, akustično osetljive supstance su i kontrastni agensi za ultrazvučnu detekciju. Ugradnja

agenasa koje odlikuje osetljivost na povišenu temperaturu i/ili promenu kiselosti (promena pH) je izuzetno važna jer se sve patološke regije u organizmu povezuju sa hipertermijom i kiselo-baznim disbalansom. Pored toga, činjenica da je intracelularni prostor redukcionog a ekstracelularni oksidacionog karaktera, uspešno se koristi za primenu nastalog redoks potencijala u kontroli otpuštanja leka unutar ćelije.<sup>[66]</sup> Nosači obeleženi redoks-osetljivim agensima (koji najčešće poseduju disulfidne veze), putuju kroz ekstracelularni prostor i u momentu ulaska u ćeliju dolazi do redukcije ovih grupa, ruši se struktura nosača i lek se otpušta.<sup>[69],[70]</sup>

### **Površinska funkcionalizacija**

Kada je reč o površinskoj funkcionalizaciji za tu namenu se koriste polielektroliti, prirodni polimeri kao što su polisaharidi, polipeptidi, polinukleotidni lipidi i multivalentne boje kojima se obezbeđuju odgovarajuća permeabilnost, stabilnost, biokompatibilnost i specifični afinitet ka vezivanju za određene receptore.<sup>[71],[72],[73]</sup> Od polimera koji se koriste za površinsku funkcionalizaciju se očekuje da budu netoksični, hidrofilni i da poseduju fleksibilni glavni lanac. Neki od najčešće korišćenih za ovu namenu su poli(vinil-pirolidon), poli(akril-amid), poli(vinil-alkohol) i poli(etilen-glikol). Poli(etilen-glikol) treba posebno izdvojiti kada su u pitanju nosači lekova za koje je namenjeno da putuju kroz krvotok ili limfotok, obzirom da on omogućava sternu stabilizaciju čestica. Ovako stabilizovane čestice ne samo što su zaštićene od međusobne agregacije, već i od interakcija sa komponentama krvi kao što su proteini krvne plazme. Ovaj vid površinske modifikacije najčešće se uspostavlja fizičkom adsorpcijom zaštitnog polimera na površini matričnog polimera ili hemijskom modifikacijom površine matričnog polimera hemijskim vezivanjem zaštitnog polimera.<sup>[71]</sup>

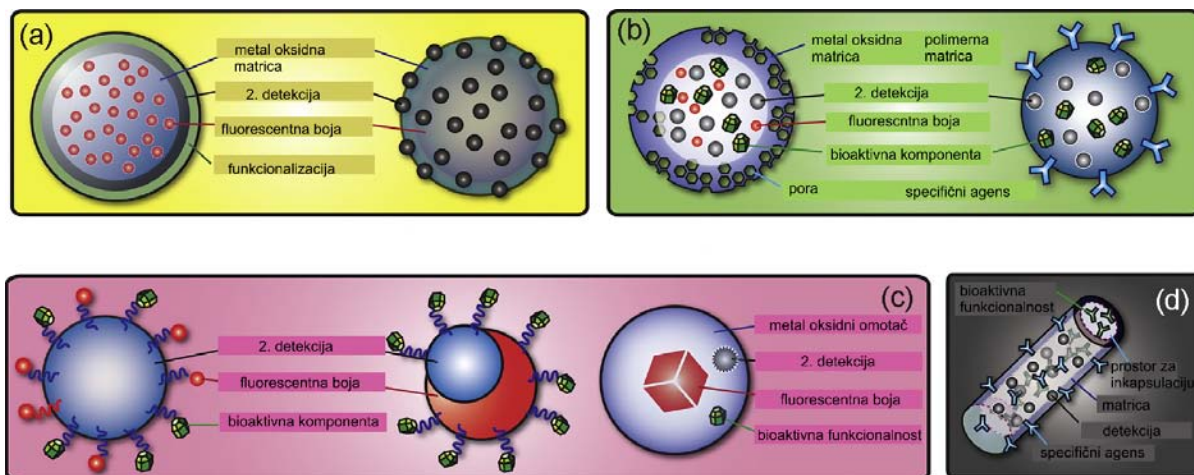
Modifikacijom površinskih svojstava nosača leka pomoću polimera najčešće se obezbeđuje poboljšana biokompatibilnost, dok se vezivanjem odgovarajućih liganada postiže funkcija vektora za ciljanu dostavu. Za tu namenu se primenjuje funkcionalizacija površine pomoću antitela, peptida, šećera, folata i drugih liganada. Njihovom primenom pruža se mogućnost vezivanja nosača za specifičnu vrstu ćelija što je od posebnog interesa u lečenju kanceroznih bolesti.<sup>[74]</sup>

### 1.3.2. „JEZGRO-OMOTAČ“ STRUKTURA MULTIFUNKCIONALNIH SISTEMA

Prilikom dizajniranja materijala koji će potencijalno biti primenjen kao nosač medikamenta, kreiranje željene funkcionalnosti u velikoj meri zavisi od izbora strukture. Simultana kontrola nad oblikom, veličinom i površinskim karakteristikama pruža mogućnost za formiranje multifunkcionalnih sistema primenljivih u različitim oblastima biomedicine sa funkcijom terapeutika, dijagnostičkog sredstva i kontrastnog agensa. Treba imati u vidu da svaki način dostave (intravaskularni, lokalni, pulmonalni ili oralni) ima sebi specifične zahteve za dizajnom kako bi mogao da ispolji navedene funkcije.<sup>[75]</sup>

Poslednjih godina intenzivno se istražuje mogućnost formiranja i praktične primene jezgro-omotač struktura. Ove strukture su pogodne za različite namene kao što su luminiscentno obeležavanje, manipulacija pomoću magnetnog polja<sup>[69]</sup> ili primena u vidu nano-reaktora za ciljanu dostavu specifičnih enzima, antigena, ćelija, gena, peptida i farmaceutskih agenasa<sup>[76],[77],[78]</sup>. Osnovni razlog za njihovu široku upotrebu zasniva se na mogućnosti obezbeđivanja precizne kontrole nad procesom lečenja. Pravilna morfologija ovih struktura je od izuzetnog značaja za dostavu medikamenata naročito zbog visokog stepena povezanosti između brzine otpuštanja leka i pojave efekta njegovog naglog, inicijalnog otpuštanja. Čestice-nosači lekova koje odlikuje uža raspodela veličina i veća uniformnost oblika imaju mogućnost da obezbede duži vremenski interval u toku kog se lek otpušta kao i da ublaže ili da potpuno eliminišu pojavu inicijalnog otpuštanja velike količine leka.<sup>[79],[80]</sup> Veličina i oblik čestica utiču i na druge aspekte njihove funkcionalnosti kao što su degradacija, brzina cirkulacije i mehanizam apsorpcije u organizmu. U slučaju polimernih čestica-nosača lekova veličina čestica je sposobna da utiče na brzinu degradacije na taj način da je kod većih čestica usled redukovane slobodne površine smanjena mogućnost penetracije vode koja indukuje hidrolitičku degradaciju ali je u isto vreme redukovana mogućnost za difuziju produkata degradacije koji imaju mogućnost da dalje katalizuju ovaj proces.<sup>[81]</sup>

Prilikom optimizacije nanostrukturnih materijala pored oblika i veličine čestica-nosača veliki akcenat je i na kontroli karakteristika sastavnih komponenata, debljini omotača, veličini i raspodeli veličina pora kao i njihovoj povezanosti. Ovo su samo neki od parametara koji doprinose procesu otpuštanja transportovanog agensa. Njihovom optimizacijom pruža se mogućnost za postizanjem fine kontrole nad kinetikom celokupnog procesa dostave medikamenta.<sup>[81]</sup>

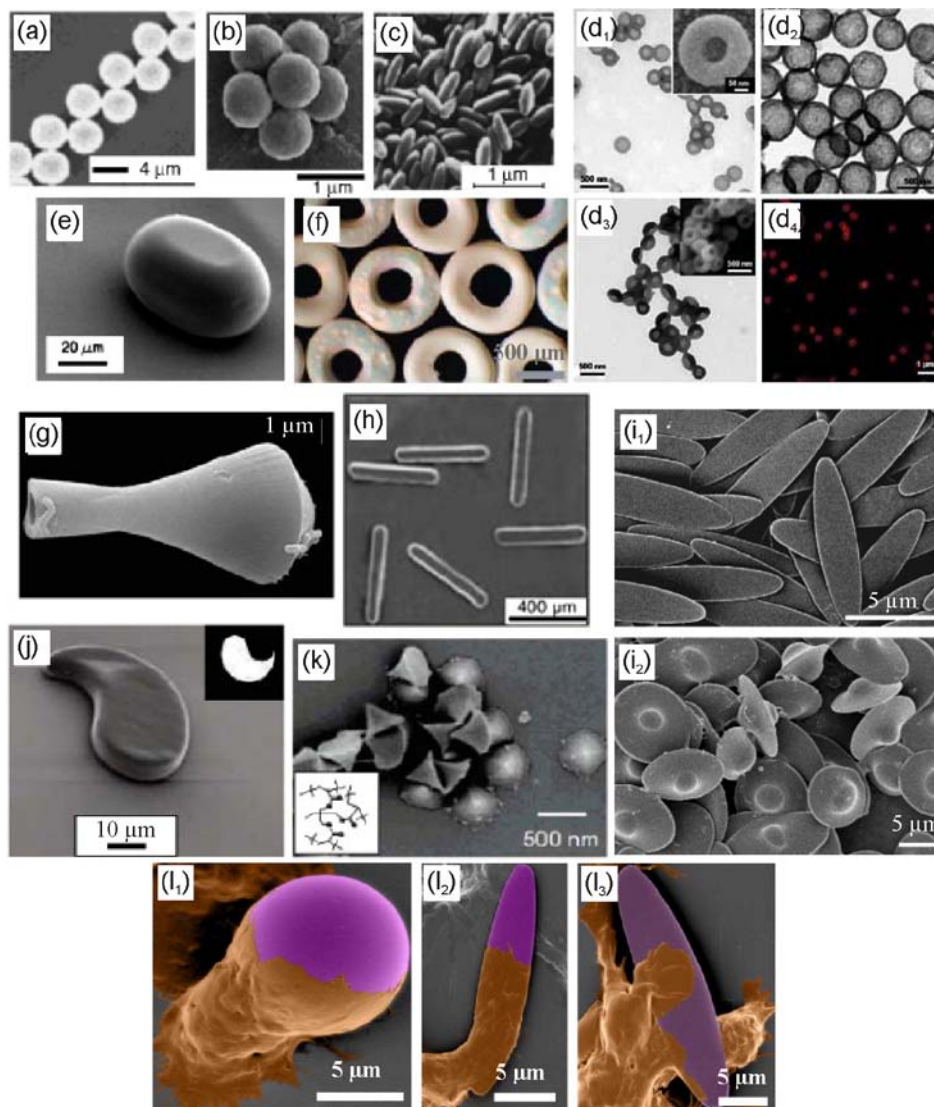


**Slika 1.8.** Formulacije jezgro-omotač struktura: (a), (b), (c) sferne i (d) oblika različitog od sfernog.<sup>[27]</sup>

Nanočestični nosači lekova se intenzivno primenjuju u današnjim strategijama za dostavu medikamenata naročito zbog visokog potencijala za neometeni transport do željenog mesta kao i mogućnosti medikacije na nivou ćelije i/ili ćelijskih komponenata.<sup>[80]</sup> Putanja kojom čestice migriraju u organizmu direktno utiče na finalno mesto na kome će biti akumulirane. To znači da od nje zavisi da li će čestice biti u mogućnosti da se transportuju na primer do kanceroznih ćelija ili će biti izbačene iz organizma pomoću makrofaga u jetri. Poznato je da vaskularni sistem ima nekoliko različitih mehanizama koje primenjuje za uklanjanje toksina koji se zasnivaju na njihovoj veličini. Mikročestice (1-5 mikrona) obično bivaju zadržane u jetri i fagocitovane pomoću Kupferovih ćelija, dok veće mikronske čestice imaju veliki afinitet da ostanu u okviru kapilara što ih čini opasnim po ljudski život. Submikronske čestice (veće od 200 nm) se mehanički filtriraju u jetri, dok su nanočestice (manje od 100 nm) sposobne da prođu kroz otvore endotelnog zida krvnih sudova prodirući u tkivo.<sup>[81]</sup> Slično je i sa pulmonalnom administracijom lekova. Čestice veličine par mikrona dospevaju do alveola, one sa veličinom od par desetina mikrona bivaju akumulirane u većim disajnim odeljcima dok se manje (submikronske) mogu izbaciti iz pluća izdisanjem. Nezavisno od načina administracije generalno pravilo je da čestice veće od 500 nm bivaju fagocitovane pomoću makrofaga, dok manje bivaju endocitovane pomoću fagocitnih ili nefagocitnih ćelija. Mogućnost preuzimanja čestica od strane ćelija pored veličine, direktno zavisi i od njihove površinske funkcionalnosti kao i od oblika. To je jedan od razloga zbog kojih je sferni oblik favorizovan. <sup>[81]</sup>



Struktura jezgro-omotač obuhvata veliku grupu formulacija koje mogu biti dizajnirane na različite načine u zavisnosti od praktičnih potreba za koje se procesiraju. Na slici 1.8 ilustrativno su predstavljene najčešće formulacije koje se mogu podeliti na sferne i oblika različitog od sfernog. [27]



**Slika 1.9.** Različite morfološke karakteristike čestica: (a) polistirenski (PS) „cik-cak“ (eng. zig-zag) niz,<sup>[82]</sup> (b) pentagonalna bipiramida sastavljena iz sedam PS sfernih čestica,<sup>[83]</sup> (c) elipsoidne PS čestice,<sup>[84]</sup> (d<sub>1-4</sub>) poli(L-laktid) i poli(glikolid) sa doksorubicinom,<sup>[85]</sup> (e) optički adhezivne polimerne čestice valjkastog oblika,<sup>[86]</sup> (f) PS čestice torusnog oblika,<sup>[87]</sup> (g) PS čestice levkastog oblika,<sup>[88]</sup> (h) štapići poliTPGDA,<sup>[89]</sup> (i<sub>1-2</sub>) PS eliptični diskovi i čestice oblika eritrocita,<sup>[90]</sup> (j) poli(etilen-glikolna) (PEG) čestica kapljičastog oblika,<sup>[91]</sup> (k) konusne čestice PEG-a; interakcija između alveolarnog makrofaga (braon) i čestica PS (purpurno) različitog oblika<sup>[92]</sup>(l<sub>1-3</sub>).

Sferne formulacije jezgro-omotač struktura su uobičajene i imaju najveći broj potencijalnih primena. Najčešći razlozi za njihovu primenu odnose se na činjenicu da sferan oblik teorijski ima najveću slobodnu površinu kao i mogućnost najgušćeg pakovanja. Ove osobine su od interesa kako za ravnomerno radijalno otpuštanje biomedicinskih agenasa, tako i za mogućnost formiranja kompaktnih implantata sa zadovoljavajućim mehaničkim karakteristikama. Biološki razlozi za njihovu primenu najčešće se odnose na lakšu interakciju ćelija sa česticama materijala kada su u pitanju procesi transporta kroz membranu kao i bolja adhezija ćelija koje imaju afinitet ka reljefnim površinama sa većom specifičnom površinom. Upotreba sfernih čestica podrazumeva i bolje reološke karakteristike što transport kroz turbulentni tok telesnih tečnosti čini sigurnijim.

Sa druge strane, upotreba čestica koje su oblika različitog od sfernog najčešće je vezana za specifične potrebe sistema za dostavu i posledica je pristupa u dizajniranju morfologije materijala koji podrazumeva oponašanje bioloških sistema. Na slici 1.9 prikazani su primeri morfoloških i strukturnih karakteristika polimernih čestica postignuti primenom različitih metoda sinteze kao i interakcija makrofaga sa česticama polistirena (PS) sfernog (slika 1<sub>1</sub>) i elipsastog (slika 1.9 1<sub>2,3</sub>) oblika.

### *1.3.3. TEHNIKE PROCESIRANJA MULTIFUNKCIONALNIH SISTEMA*

---

Izbor tehnike procesiranja je od veoma velikog značaja u toku dizajniranja strukture materijala. Metode koje se koriste za formiranje jezgro-omotač struktura u kojima je bar jedna komponenta polimerna mogu se podeliti na:

#### **(1) Polimerizacione metode:**

- (a) *Emulziona polimerizacija.* (Zasnovana je na polimerizaciji monomera rastvorenog u fazi koja je emulgovana u određenom nerastvaraču) [62]
- (b) *Suspensiona polimerizacija.* (Zasnovana je na polimerizaciji monomera koji je kao čvrsta faza suspendovan u određenom nerastvaraču) [62]

#### **(2) Metode procesiranja prethodno sintetisanih polimera:**

- (a) *Nanoprecipitacija.* (Metoda je zasnovana na precipitaciji hidrofobnih supstanci zajedno sa precipitacijom polimera u toku formiranja emulzije voda/ulje tako da



hidrofobna supstanca ostaje inkapsulirana u okviru polimera sa dodatkom vodene faze u višku.)<sup>[93]</sup>

- (b) *Emulziona-difuziona metoda.* (Ova emulziona metoda zasnovana je na difuziji molekula rastvarača polimera nakon dodatka polimernog nerastvarača čime se inicira njegova precipitacija. On tada formira omotač u čijem jezgru je zarobljena faza nerastvarača polimera. Ako je rastvarač polimera voda onda je metoda poznata kao emulzija vode u ulju, a ako je rastvarač polimera uljana faza metoda je poznata kao emulzija ulja u vodi)<sup>[94]</sup>
- (c) *Emulziona-evaporaciona metoda.* (Zasniva se na istom principu kao i prethodno navedena metoda sa tom razlikom da se umesto difuzije rastvarača polimera primenjuje njegovo isparavanje.)<sup>[94]</sup>
- (d) *Metoda dvostrukog emulgovanja.* (Princip metode je takav da je u prvom koraku mala količina vodenog rastvora (voda 1) emulgovana u uljanoj fazi (ulje) koja sadrži polimer. Dodatkom drugog vodenog rastvora u višku (voda 2) i dodatnog emulgovanja inicira se precipitacija polimera iz uljane faze. Polimer tada formira omotač oko prve vodene faze. Metoda je poznata kao emulzija voda1/ulje/voda2. U slučaju da je umesto prve vodene faze primenjena čvrsta faza, metoda je poznata kao emulzija čvrsta faza/ulje/voda.)<sup>[93],[95]</sup>
- (e) *Emulziona-koacervacijska metoda.* (Metoda zasnovana na formiranju klastera u toku emulgovanja dve faze od kojih jedna sadrži polimer. Nakon precipitacije polimera klasteri ostaju zarobljeni u njegovom jezgru.)<sup>[62]</sup>
- (f) *Metoda „sloj-po-sloj“ (eng. „layer-by-layer“).* (Metoda je zasnovana na elektrostatičkom nanošenju pozitivno ili negativno naelektrisanog polielektrolita na površini suprotno naelektrisanog jezgra.)<sup>[96]</sup>

Ove osnovne metode formiranja jezgro-omotač struktura često su modifikovane što je omogućilo razvoj različitih tehnika za formiranje ovih struktura. Na taj način postignuta su određena poboljšanja i veća prilagođenost metoda potrebama procesiranja specifičnih materijala.

## Ultrasonifikacija

Procesiranje u polju ultrazvuka zasniva se na primeni fizičkih i hemijskih efekata koji nastaju usled interakcije ultrazvučnih talasa sa tečnim i/ili čvrstim medijumom. Hemijski efekti ultrazvuka omogućavaju formiranje aktivnih radikala rastvarača i prekursora što je posledica procesa sonolize dok fizički efekti obezbeđuju intenzivno emulgovanje, homogenizaciju i dispergovanje. Tehnika ultrasonifikacije pruža mogućnost formiranja jezgro-omotač struktura kako neorganskih, tako i organskih i polimernih sistema. U slučaju polimera ova struktura se postiže primenom oba pristupa- polimerizacije i procesiranja polimera. Prilikom tih procesa obezbeđuje se poboljšanje stepena efikasnosti inkapsulacije i postiže se veća pravilnost u morfološkim karakteristikama materijala-nosača leka. Amplituda, intenzitet, frekvencija i snaga ultrazvučnog polja mogu biti modifikovani što obezbeđuje kontrolu nad procesom homogenizacije i omogućava formiranje nespecifičnih struktura. Kao primer moguće je navesti formiranje jezgro-omotač strukture  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  kompozita dobijenog metodom sonohemijske sinteze.<sup>[97]</sup> Ova metoda omogućava efikasnu deaglomeraciju neorganskih čestica čijim se finim dispergovanjem u rastvoru polimera neposredno pre njegove precipitacije omogućava formiranje jezgro-omotač strukture u kojoj je neorganski deo obložen polimerom. Jedan od primera je formiranje jezgro-omotač strukture PLGA/HAp kompozitnog materijala<sup>[16]</sup> kao i inkapsulacija antibiotika u okviru PLGA/HAp jezgro-omotač strukture.<sup>[23]</sup>

## Tehnika miniemulzije

Ova tehnika predstavlja poseban vid emulzione metode kod koje se emulgovanje postiže ultrasonifikacijom (pomoću ultrazvučne sonde) ili intenzivnom homogenizacijom (pomoću homogenizatora). Termin „miniemulzija“ odnosi se na mogućnost formiranja malih, stabilnih kapljica emulgovanjem jedne faze u drugoj što se postiže primenom visokog pritiska koji obezbeđuju sonifikacija ili homogenizacija. U slučaju visokog pritiska koji se postiže primenom sonifikacije, makro-kapljice široke raspodele veličina (koje se dobijaju klasičnom metodom emulzije) razbijaju se u mikro-kapljice bolje definisanog oblika i uže raspodele veličina. Veličina kapljica je od 50 nm do 500 nm i zavisi kako od ultrazvučnih parametara tako i od vrste i količine emulgatora i ko-stabilizatora.<sup>[98]</sup>

Na slici 1.10. ilustrovani su primeri različitih načina koncipiranja mikroemulzione metode u cilju formiranja jezgro-omotač strukture. Za formiranje kapsula obično se primenjuju dva pristupa: procesiranje prethodno napravljenih polimera ili sinteza polimera.

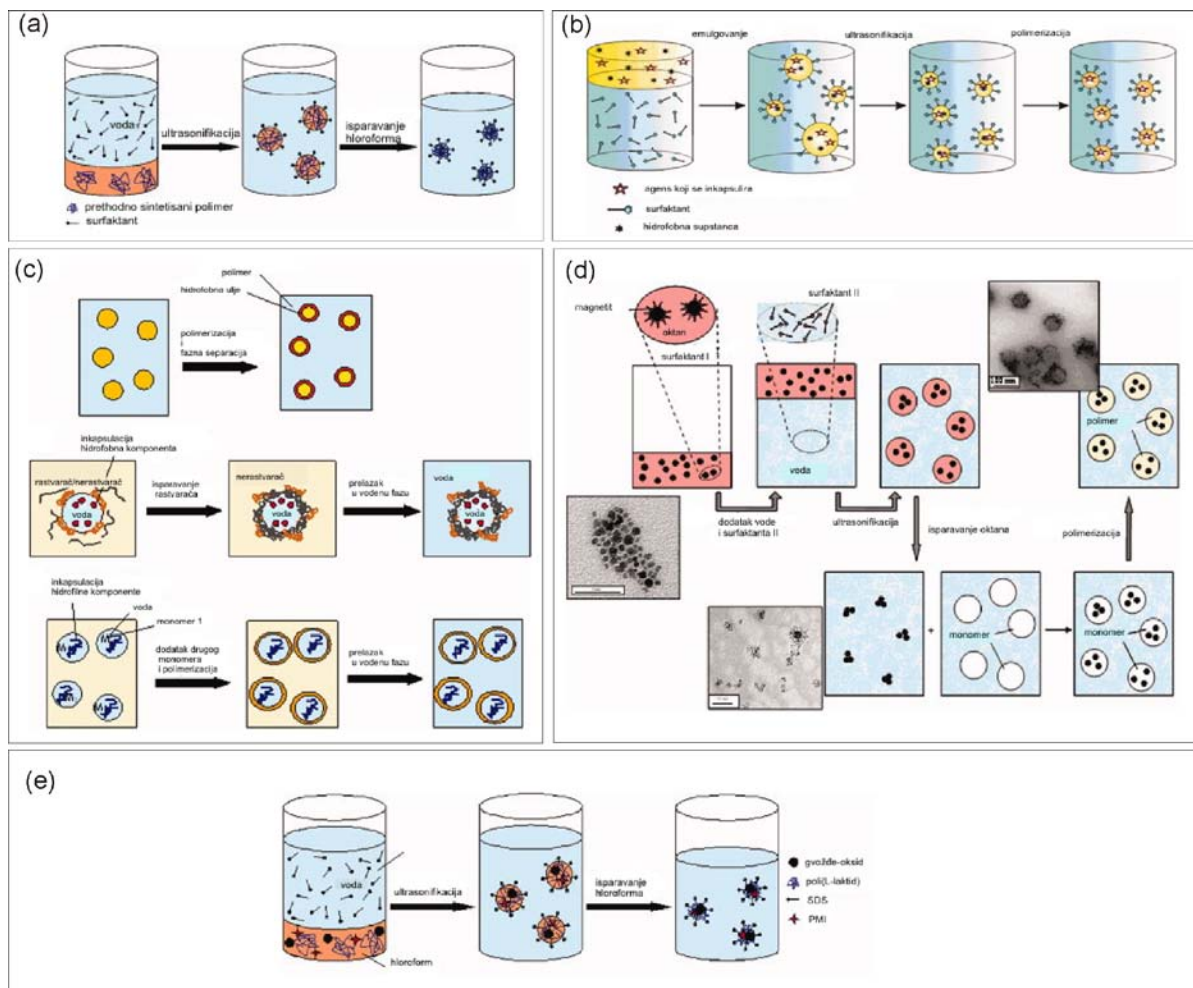
Metoda procesiranja polimera primenom mikroemulzije prikazana je na slici 1.10.a. Kod ove metode primenjuju se dve faze: vodena u kojoj je stabilizator i organska u kojoj je polimer. Sonifikacijom se postiže formiranje kapljica organske faze u vodenoj. Nakon uparavanja rastvarača zaostaje disperzija polimernih čestica u vodi čija je površina zaštićena od agregacije. [98]

Miniemulziona polimerizacija (slika 1.10b) je zasnovana na primeni rastvora monomera u uljanoj fazi i rastvora surfaktanta u vodenoj fazi. Uljanoj fazi se takođe dodaje hidrofobna supstanca koja nakon inkapsulacije u okviru polimera omogućava orijentaciju hidrofobnih grupa ka unutrašnjosti kapsule. Nakon sonifikacije formiraju se kapljice koje su minireaktori u kojima se dešava proces polimerizacije. Doprinos sonifikacije je u mogućnosti formiranja radikala koji su potrebni za polimerizaciju bez primene inicijatora. Ovakvo tehnološko rešenje je prvenstveno od značaja zbog eliminacije zaostajanja inicijatora u polimeru nakon sinteze. Za razliku od ovog pristupa, nakon klasične sinteze polimera inicijatori zaostaju u materijalu što ima za posledicu njihovu ograničenu primenu. To se naročito odnosi na polimere koji su namenjeni za biomedicinsku namenu. [98]

Unutar polimernih čestica moguće je inkapsulirati supstance različite hidrofilnosti. Za tu namenu se u slučaju polimerizacije mikroemulzione metode najčešće primenjuje fazna separacija. Na početku vodeni rastvor monomera i uljana faza su fino dispergovani. Sonifikacijom se postiže polimerizacija nakon koje se dešava odvajanje faza i polimer biva presvučen hidrofobnom uljanom fazom. Na ovaj način formiraju se hidrofobni omotač i hidrofilno jezgro. [98]

Prilikom procesiranja prethodno sintetisanog polimera koristi se metoda nanoprecipitacije. Hidrofilna faza koju je potrebno inkapsulirati nalazi se rastvorena u vodi. Kapljice vode su dispergovane u smeši rastvarača i nerastvarača polimera. Nakon uparavanja rastvarača polimera, zaostaje njegov nerastvarač i dešava se precipitacija polimera u čijoj unutrašnjosti zaostaju kapljice vode sa hidrofilnom supstancom koja se na ovaj način inkapsulira. Druga mogućnost za inkapsulaciju hidrofilne supstance je da se ona nalazi u

vodenom rastvoru zajedno sa monomerom 1. Vodena faza je dispergovana u organskoj i nakon polimerizacije dobija se inkapsulacija hidrofilne supstance u polimeru 1. Nakon toga se organskoj fazi dodaje monomer 2 koji polimerizuje na površini prethodno formiranih čestica polimera 1. Na taj način se dobijaju hidrofobni polimerni omotač u okviru kog je hidrofilno polimerno jezgro sa inkapsuliranom hidrofilnom supstancom (slika 1.10c). [98]



**Slika 1.10.** Metoda mikroemulzije: (a) miniemulziona polimerizacija, (b) procesiranje prethodno sintetisanog polimera kombinacijom metode rastvarač/nerastvarač i metode mikroemulzije, (c) formiranje nanokapsula kombinacijom fazne separacije, nanoprecipitacije i površinske polimerizacije miniemulzionom tehnikom, (d) trostepeni proces formiranja agregata i njihove inkapsulacije u okviru polimerne matrice, (e) formiranje biodegradabilnog i fluorescentno obeleženog polilaktida sa inkapsuliranim gvožđe-oksidom kombinacijom miniemulzije i metode rastvarač/nerastvarač. [98]

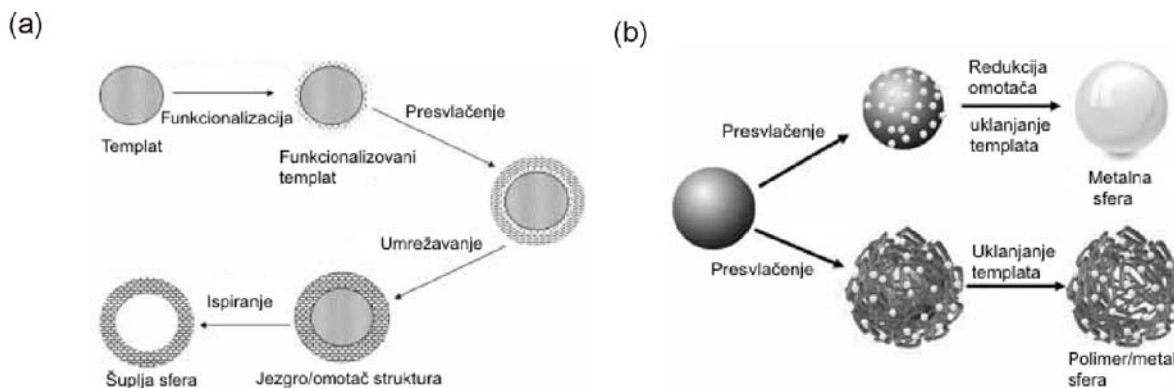
Primer mikroemulzione metode koja se odnosi na inkapsulaciju markera u okviru polimerne matrice ilustrovan je na slici 1.10d. Fine čestice magnetita dispergovane su zajedno sa surfaktantom 1 u uljanoj fazi (oktanu). Primenom sonifikacije formiraju se kapljice uljane faze (sa magnetitom) u vodi koja sadrži surfaktant 2. Uparavanjem oktana dobijaju se agregati čestica magnetita u vodenoj fazi. Nakon dodatka monomera i njegove polimerizacije, rezultujući polimer precipitira na površini agregata magnetita gradeći polimerni omotač. [98]

Drugi praktični primer primene ove metode odnosi se na formiranje polimernih čestica poli(laktida) sa inkapsuliranim magnetitom i fluorescentnom bojom. Metoda je prilično jednostavna i podrazumeva vodenu fazu sa surfaktantom i uljanu u kojoj je rastvoren poli(laktid) i dispergovani magnetit i fluorescentna boja. Sonifikacijom uljana faza formira kapljice u vodenoj i nakon uparavanja rastvarača polimera (uljane faze) formiraju se polimerne kapsule sa magnetitom i fluorescentnom bojom u jezgru (slika 1.10e). [98]

### **Tehnike templiranja**

Tehnike templiranja se uglavnom koriste za formiranje kapsula- jezgro-omotač struktura kod kojih je jezgro templat koji se u toku procesiranja uklanja ostavljajući šupljinu. Ovako formirana struktura pruža prostorno veliki kapacitet za inkapsulaciju što je od velike koristi za biomakromolekule velikih molekulskih masa poput proteina i nukleinskih kiselina. Generalna shema na kojoj se zasniva ova tehnika prikazana je na slici 1.11a. Nakon formiranja čestica templat odgovarajućih morfoloških karakteristika, za njegovu površinu se vezuju funkcionalne grupe koje omogućavaju oblaganje materijalom koji se procesira. Umrežavanjem površinskog sloja formira se stabilna jezgro-omotač struktura. Nakon ispiranja, templat-jezgro biva uklonjen i kao rezultat dobija se kapsula izgrađena iz procesiranog materijala. Templat može da sadrži aktivnu komponentu koja nakon njegovog uklanjanja ostaje inkapsulirana u okviru omotača. Primer formiranja jezgro/omotač struktura primenom ove metode ilustrovan je na slici 1.11b. U ovom slučaju templat je moguće obložiti metalnim prekursorom čijom se redukcijom formira omotač. Uklanjanjem templat formira se metalna sfera izgrađena iz omotača i šupljeg jezgra. Druga mogućnost je istovremeno oblaganje templat polimerom i metalnim prekursorom. Nakon redukcije metalnog prekursora i uklanjanja jezgra dobija se polimerno/metalna sfera sa šupljim jezgrom. Proces je moguće dalje optimizirati na taj način da templat sadrži i/ili da bude izgrađen iz metalnog prekursora čime bi se postigla inkapsulacija metalnih čestica kao jezgra u okviru polimernog omotača.[78] Metoda je

interesantna jer se pored sfernih mogu dobiti jezgro-omotač strukture drugih oblika u zavisnosti od oblika templata. Jedan od primera je formiranje nanotuba.<sup>[99]</sup>



**Slika 1.11:** Metoda templiranja: (a) opšti princip metode, (b) primer formiranja metalne čestice i čestice metala presvučene polimerom. <sup>[78]</sup>

## 1.4. DOSTAVA ANTIBIOTIKA

### 1.4.1. INFEKCIJSKE BOLESTI KOŠTANOG TKIVA

Koštano tkivo je pod normalnim okolnostima dobro zaštićeno od infekcija. Međutim situacije kao što su otvoreni prelomi, hirurške intervencije, ugradnja implantata ili prisustvo žarišta infekcije mekog tkiva u organizmu, su uobičajeni razlozi koji dovode do nastanka infekcije koštanog tkiva. Statistički gledano udeo broja slučajeva sa pojavom infekcije u poređenju sa brojem ugrađenih implantata nije veliki, ali se sa povećanjem potrebe za ugrađivanjem implantata (skoro milion godišnje) broj slučajeva sa pojavom infekcije značajno povećava (slika 1.12a,b).<sup>[100]</sup> Ova vrsta infekcija je najčešće izazvana bakterijama, dok je u ređim slučajevima izazvana virusima ili gljivicama (slika 1.12c). Zapaženo je da tip bakterije koja će uzrokovati ovu vrstu infekcija zavisi od starosti pacijenta i da su najugroženije grupe deca i starije osobe.

Bakterije napadaju koštano tkivo na tri načina:

- (a) *Putem krvotoka* (prenos bakterija iz drugog inficiranog dela organizma).<sup>[101]</sup>
- (b) *Direktno* (u slučaju otvorenih preloma ili hirurških intervencija)<sup>[102]</sup>
- (c) *Putem implantata* (usled adhezije na implantatu).<sup>[100]</sup>

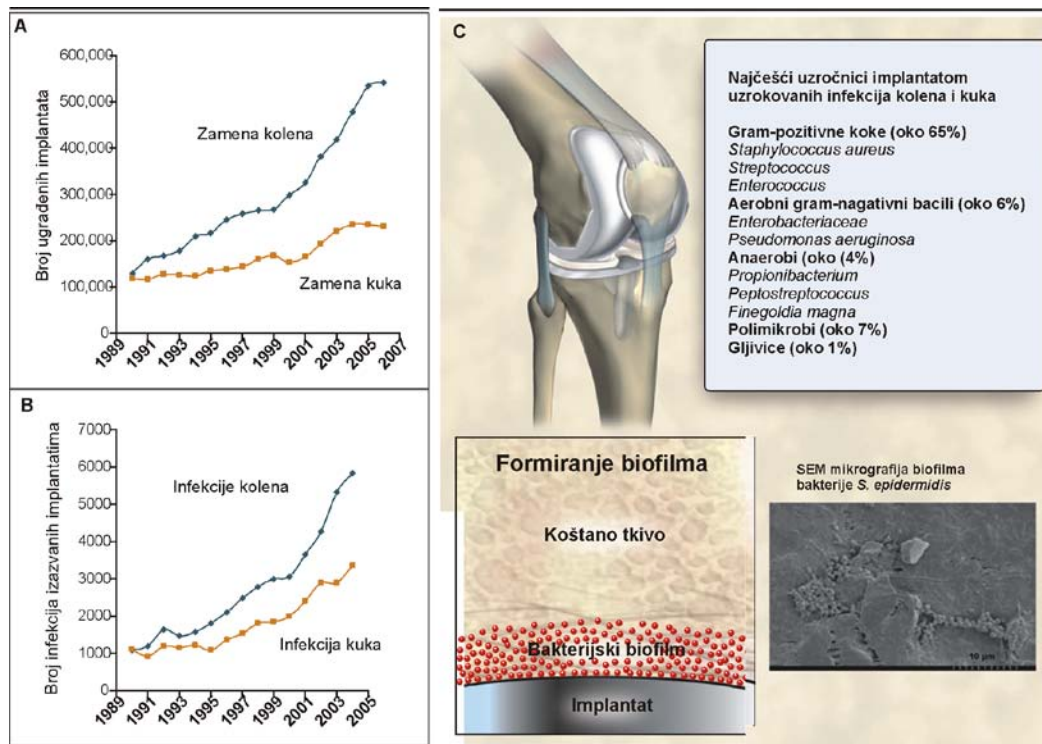
**Razvoj infekcije.** Infekcija koštanog tkiva podrazumeva dva stadijuma: rani i pozni. U ranom stadijumu mikroorganizmi su mobilni i nemaju razvijenu otpornost prema antibioticima i imunološkoj odbrani organizma. U ovom stadijumu lečenje je relativno jednostavno i podrazumeva eliminaciju mrtvog tkiva (ukoliko je formirano), čišćenje mesta infekcije i/ili samo antibiotsku terapiju. Usled nedovoljno efikasnog tretmana ili nelečenja ranog stadijuma, nastupa kasni stadijum. U tom slučaju uspostavljena je interakcija između površinskih makromolekula tkiva i patogena. Posledica toga je formiranje mikrozona koje grade male skupine bakterija vezane za površinu tkiva. Neke vrste bakterija (naročito one koje adheriraju za površinu implantata) imaju mogućnost formiranja mukopolisaharidnog biofilma (slika 1.12c) koji obavija celu jednu koloniju bakterija koja se razvila na površini koštanog tkiva. Formirani film je sa jedne strane medijum koji deluje stimulatивно na ishranu, rast i razmnožavanje bakterija, dok je sa druge strane barijera koja onemogućava dostupnost antibiotika i agenasa imunološke odbrane do bakterija tako da one postaju izuzetno dobro zaštićene. Kao posledica, toksini koje formiraju patogeni zajedno sa rastućom koncentracijom produkata metabolizma koje organizam formira usled neuspešnog pokušaja da razbije biofilm, značajno uništavaju koštano tkivo. Jedini način lečenja je hirurško uklanjanje biofilma, zajedno sa okolnim oštećenim tkivom i eventualno prisutnim implantatom nakon čega se nastavlja sa antibiotskom terapijom. Biofilm ne predstavlja barijeru za bakterije koje se u okviru njega nalaze. One mogu da se odvoje od kolonije i da plutaju kao u ranom stadijumu što sa sobom povlači mogućnost razvoja ponovne infekcije. Nakon nezavršenog lečenja i učestalih pojava infekcije ona prelazi u hroničan oblik čiji je tretman prilično zahtevan i dugotrajan.

[102],[103]

Najčešće i najteže infekcije koštanog tkiva su osteomijelitis, koji zahvata kosti, i infektivni (septički) artritis koji zahvata zglobove.

**Osteomijelitis.** Ova infektivna bolest kostiju praćena je rušenjem strukture koštanog tkiva i gubljenjem koštane mase koja dovodi do razvoja lokalizovane osteoporoze. Mehanizam razvoja bolesti podrazumeva skupljanje krvnih sudova usled inflamatornog procesa što uzrokuje slabu prokrvljenost (ishemiju) i posledično izumiranje tkiva (nekrozu). Glavni uzročnik ove bolesti je bakterija *Staphylococcus aureus*. Postoje četiri osnovna tipa osteomijelitisa: (a) medularni- koji obuhvata unutrašnje slojeve kosti, (b) superfacijalni- koji obuhvata površinski sloj kosti, (c) lokalizovani- koji se može javiti kao stabilan segment u bilo





**Slika 1.12.** Infekcije uzrokovane implantiranjem: (a) statistički podaci o broju izvršenih operacija ugrađivanja veštačkog kuka i veštačkog kolena (b) broj slučajev kod kojih se razvila infekcija (podaci iz Centra za kontrolu i prevenciju bolesti, Atlanta); (c) ilustracija formiranja bakterijskog biofilma i najčešći uzročnici implantatom uzrokovanih infekcija.<sup>[102]</sup>

kom delu kosti i (d) difuzni- koji pored koštanog zahvata i okolno meko tkivo. Konstantna pojava simptoma bolesti u toku deset dana povezuje se sa pojavom nekroze i hroničnog oblika ove bolesti. <sup>[103],[104]</sup>

**Septički arthritis.** Odnosi se na bolest koja dovodi do najbržeg rušenja strukture zglobova. Bakterije (najčešće *Staphylococcus aureus*) ulaze unutar zglobne šupljine (ili unutra budu unete u toku hirurške intervencije na zglobu) nakon čega u toku par dana ili u težim slučajevima u toku par sati luče toksine koji uništavaju hrskavicu i ruše konstrukciju zgloba.<sup>[105]</sup>



### 1.4.2. TRADICIONALNA DOSTAVA ANTIBIOTIKA

---

Tradicionalan način lečenja infekcijskih bolesti koštanog tkiva koji se danas primenjuje u praksi podrazumeva nekoliko faza. Prvi korak je primena antibiotika širokog spektra dejstva pre identifikacije patogena koji je uzrokovao infekciju. Antibiotik se primenjuje oralno ili intravenski tako da se u krvnoj plazmi postigne najmanje šest puta veća koncentracija leka u odnosu na srednju baktericidnu koncentraciju.<sup>[101]</sup> Ovaj antibiotik se primenjuje do mogućnosti primene specifičnog leka protiv izazivača infekcije.<sup>[102],[104]</sup>

Nedovoljna osetljivost biohemijskih metoda koje se danas primenjuju u praksi dodatno otežava proces dijagnostike bolesti. Laboratorijske analize (koncentracija leukocita, sedimentacija eritrocita kao i koncentracija elektrolita) najčešće pokazuju normalne vrednosti i pored razvoja infekcije (usled nedovoljne senzitivnosti) ili ukazuju na različita patološka stanja (usled nespecificnosti). Dijagnoza tehnikama slikanja ima isti problem nedovoljne senzitivnosti i specifičnosti, naročito u slučaju klasične planarne radiografije.<sup>[100],[103]</sup> Iz tog razloga analizira se osetljivost organizama izolovanih sa mesta infekcije (koji se dodatno kultiviraju) na različite antibiotike. Najveći problem predstavljaju gljivice i mikobakterije (uzročnici 80% septičkih artritisa nastalih usled ugradnje veštačkih zglobova u Engleskoj i Velsu)<sup>[105]</sup> čije verifikovanje može trajati i nekoliko nedelja.<sup>[102]</sup>

U nekim slučajevima infekcija nastala usled ugradnje implantata leči se samo antibioticima.<sup>[100]</sup> Na žalost u nekim slučajevima biofilm koji formiraju bakterije nije moguće ukloniti pomoću hemijskih agenasa. Iz tog razloga on se fizički (hirurški) uklanja zajedno sa celokupnim nastalim nekrotičkim tkivom i eventualno prisutnim implantatom uz intenzivnu antibiotsku terapiju.<sup>[100],[102]</sup> Novi implantat se ugrađuje nakon intervala od 3-6 meseci.<sup>[100]</sup>

Kao što je već rečeno, za razliku od antibiotika za koje je biofilm barijera kroz koju ne mogu proći, to nije slučaj i sa bakterijama unutar njega. Velika je verovatnoća da one migriraju van filma i da nastave da plutaju kao u prvoj fazi infekcije. One tada predstavljaju potencijalni izvor novih infekcijskih žarišta i nakon uklanjanja biofilma i implantata. To je glavni razlog zbog koga se nastavlja sa visokom koncentracijom antibiotika u krvnoj plazmi kako bi se potencijalno prisustvo zaostalih patogena uklonilo.<sup>[102]</sup>

Antibiotici se primenjuju oralno ili intravenski u zavisnosti od njihove biološke dostupnosti. Uobičajeno je da intravenska primena antibiotika traje 2-4 nedelje, parenteralna u toku 6 nedelja ili, nešto ređe, oralna u toku 3-6 meseci.<sup>[100],[103]</sup> Kod dece se koriste isključivo parenteralna primena antibiotika nakon koje se primenjuje oralna u toku nekoliko nedelja.<sup>[103],[106]</sup>

Ovakav način lečenja ima veliki broj nedostataka. Najveći učinak lečenja postiže se ukoliko se infekcija uoči u ranom stadijumu.<sup>[102],[103]</sup> Međutim rane stadijume infekcije nije jednostavno detektovati. Za to vreme infekcija napreduje naročito kod septičkog artritisa kod koga postoji mogućnost da ceo zglob bude uništen u toku par dana, a u težim slučajevima i u toku par sati.<sup>[105]</sup> Intravezna ili oralna primena antibiotika širokog spektra dejstva je jedno od rešenja. Međutim, idealno mesto za akumuliranje bakterija je nekrotičko (mrtvo) tkivo ili implantat koji nisu prokrvljeni. U tom slučaju ovaj način administracije nema efekta.<sup>[103]</sup> Primena visokih doza antibiotika je moguće rešenje, ali u tom slučaju njegov nivo u krvnoj plazmi postaje značajno veći nego na mestu na kom bi trebao da deluje i antibiotik se nagomilava u drugim regijama organizma. Postoji problem i sa nepreciznim vremenskim intervalom u toku kog se lek primenjuje koji se obično intuitivno procenjuje.<sup>[100]</sup> U slučaju neadekvatne terapije, bolest prelazi u hroničan oblik koji se može lečiti godinama nakon operacije.<sup>[100]</sup> Ovakav način lečenja najpre podrazumeva mogućnost pojave neželjenih efekata usled dugog vremenskog intervala u toku kog se primenjuju intravenski kateteri (kod intravenske primene antibiotika), izuzetno povećava mogućnost za pojavu neželjenih efekata antibiotika zbog nagomilavanja u drugim organima, pojavu rezistentnih vrsta, pad imuniteta a zatim i neophodnost dugotrajne hospitalizacije koja sa sobom povlači kako lične tako i ekonomske nedostatke.<sup>[103],[107],[108],[109]</sup>

---

### *1.4.3. KONTROLISANA DOSTAVA ANTIBIOTIKA*

---

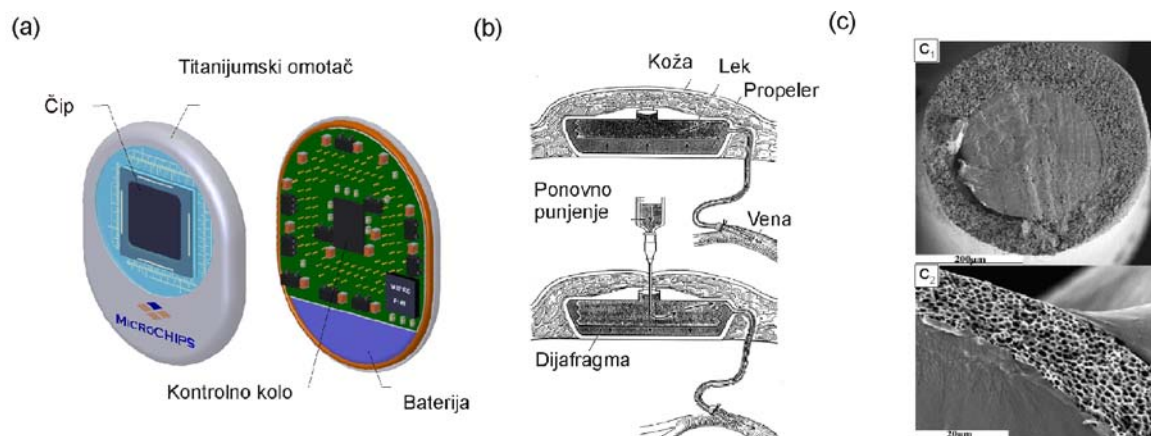
#### *1.4.3.1. PRINCIP KONTROLISANE DOSTAVE ANTIBIOTIKA*

---

Idealan način dostave antibiotika zahteva njihovo postepeno otpuštanje i dejstvo na specifičnom mestu u organizmu. Iz tog razloga razvijeni su napredniji sistemi za dostavu sa ciljem optimizacije njihovog terapijskog efekta radi postizanja veće sigurnosti, efektivnosti i pouzdanosti prilikom lečenja.<sup>[1]</sup> Implantati su jedan od najefikasnijih sistema za dostavu antibiotika.<sup>[110]</sup> Mogu služiti kao sistemi za dostavu antibiotika u cilju lečenja (osteomijelitisa

npr.)<sup>[111],[112]</sup> ili kao materijali koji služe za reparaciju i regeneraciju tkiva sa preventivno prisutnim antibakterijskim agensom<sup>[113]</sup>. Ovi sistemi se generalno mogu podeliti na:

1. *Sisteme za mikroskopski kontrolisanu dostavu*- implantirajuće pumpe (samo za terapijsku dostavu)<sup>[1],[114]</sup>
2. *Sisteme za molekularno kontrolisanu dostavu*- implantirajući materijali (polimerni, biokeramički i kompozitni) (za preventivnu i terapijsku dostavu)<sup>[1],[114]</sup>



**Slika 1.13:** Implantirajuća pumpa za dostavu antibiotika: (a) mikroelektronika i (b) mehanizam ponovnog punjenja. Implantat izgrađen iz kompozitnih vlakana sa inkapsuliranim gentamicinom: (c<sub>1</sub>) presek vlakna i (c<sub>2</sub>) fina struktura preseka implantata. <sup>[1],[114]</sup>

**Implantirajuće pumpe.** Predstavljaju jedan od načina za lokalnu, kontrolisanu dostavu antibiotika. Ovi implantati su najčešće postavljeni potkožno. Kontrola nad procesom otpuštanja leka postiže se na mikro-nivou primenom mikrotehnologije elektronskog sistema i daljinske kontrole brzine protoka leka koja se postiže uspostavljanjem konstantne razlike pritiska (slika 1.13a). Glavna prednost ovih uređaja je mogućnost dopunjavanja novom količinom medikamenta nakon što se prethodna iskoristi (slika 1.13b). Ovakvi uređaji koriste se isključivo u terapijske svrhe. <sup>[1],[114]</sup>

**Polimerni, biokeramički i kompozitni sistemi.** Pripadaju generaciji implantata za dostavu antibiotika koja je razvijena u isto vreme kad i implantirajuće pumpe sa unapređenim mogućnostima terapijske, preventivne i funkcije implantata za reparaciju i rekonstrukciju tkiva i organa. Fina struktura ovih uređaja (1.13.c) pruža napredniji dizajn kontrole otpuštanja leka na nivou molekula. Oni predstavljaju rezervoare iz kojih otpuštanje leka zavisi

od rastvorljivosti i difuzionog koeficijenta leka, efikasnosti inkapsulacije, kao i od kinetike degradacije/resorpcije molekula nosača (u slučaju biodegradabilnih/bioresorbilnih materijala).<sup>[1], [11]</sup>

#### 1.4.3.2. PREDNOSTI KONTROLISANE DOSTAVE ANTIBIOTIKA

---

Glavne prednost sistema za kontrolisanu dostavu antibiotika u odnosu na tradicionalne su:

1. *Ciljana lokalna dostava leka na mesto infekcije.* Primenom lokalno postavljenog implantata lek je u neposrednoj blizini mesta na kom treba da deluje tako da nema gubitaka usled njegove distribucije u različitim delovima organizma pre nego što dospe do mesta na kom je njegovo dejstvo predviđeno što je slučaj sa tradicionalnom dostavom. Od izuzetne je važnosti činjenica da pružaju mogućnost inhibicije infekcije u početnoj fazi, kada je njen tretman najjednostavniji i najefikasniji, što sprečava dalji razvoj i komplikovanje bolesti.<sup>[1]</sup>
2. *Kontrola nad koncentracijom leka koji se u toku vremena lokalno otpusti.* Pažljivim dizajniranjem osobina nosača leka, uspostavlja se kontrola nad njegovim otpuštanjem u željenom vremenskom intervalu (koji može da traje i par godina) tako da nema potrebe za učestalim doziranjem (kao što je oralna primena antibiotika na 6 ili 8 sati) ili konstantnim doziranjem (intravenska primena antibiotika) kao ni za hospitalizacijom pošto su potrebe za posmatranjem napretka terapije minimalne.<sup>[1]</sup>
3. *Niža koncentracija leka potrebna za lečenje bolesti.* Lakši način za postizanje neophodne koncentracije leka na mestu infekcije (isključuje neophodnost primene minimum šest puta veće koncentracije leka u plazmi u odnosu na njegovu srednju baktericidnu koncentraciju koja se primenjuje u lečenju infekcija koštanog tkiva).<sup>[1]</sup>
4. *Minimalizacija ili eliminacija neželjenih efekata.* Kao posledica lokalizovanosti dostave antibiotika i daleko nižih koncentracija koje su potrebne za postizanje efektivne koncentracije leka na mestu infekcije postoji mogućnost za smanjenje ili eliminisanje neželjenih efekata. Tome najviše doprinosi lokalizovanost, obzirom na poznate neželjene efekte koje određene vrste lekova mogu prouzrokovati u digestivnom traktu, nakon oralne primene.<sup>[1]</sup>

5. *Zaštita formi lekova koje su nestabilne u in vivo uslovima.* Lek je unutar implantata fizički zaštićen od produkata metabolizma koji ga u suprotnom mogu uništiti (što je daleko napredniji pristup za prevazilaženje problema nestabilnosti leka koji se kod tradicionalnih metoda rešava učestalijim doziranjem).<sup>[1]</sup>
6. *Poboljšanje efikasnosti lečenja.* Finalna posledica svih do sada navedenih prednosti kontrolisane lokalne u odnosu na tradicionalnu dostavu antibiotika. Lokalizacijom lečenja postižu se veća selektivnost i preciznost što dovodi do većeg učinka lečenja.<sup>[1],[30] [33],[115]</sup>
7. *Poboljšanje post-operatione profilakse.* Svaka operaciona procedura je podložna infekcijama. Iz tog razloga svaka od njih je praćena preventivnom antibiotskom terapijom. Površina biomaterijala ima povećanu sklonost za kolonizaciju bakterija iz više razloga. Neki od njih se odnose na fiziološke i metaboličke promene koje nastaju u organizmu nakon ugrađivanja implantata koje povećavaju verovatnoću za razvoj infekcije na mestu njegove ugradnje. Drugi se odnose na svojstva biomaterijala, kao što su površinske karakteristike i hrapavost, koja se kod ove vrste materijala dizajniraju tako da omoguće dobru vrstu interakcije sa ćelijama (što na žalost ne isključuje i dobru interakciju sa bakterijama). U svakom slučaju, ukoliko bakterije stignu do površine ugrađenog implantata, mnoge od njih će imati veliku verovatnoću da se za nju vežu tako da se preventivnom ugradnjom antibiotika u biomaterijal od kog je implantat napravljen ovaj problem može efikasno rešiti.<sup>[113]</sup>

#### 1.4.3.3. NEDOSTACI KONTROLISANE DOSTAVE ANTIBIOTIKA

---

I pored brojnih prednosti koje su vezane za karakteristike kontrolisane, lokalne dostave antibiotika putem implantata u odnosu na klasičan pristup, njihova šira primena u praksi i dalje nije razvijena. Glavni nedostaci koji ograničavaju primenu ovih implantata su:

1. *Materijali nosači antibiotika.* Upotreba neadekvatnih materijala koji su dizajnirani za izgradnju implantata koji bi u isto vreme bili nosači antibiotika je jedan od glavnih problema ovog načina dostave antibiotika.

- (a) Bionedegradabilni polimeri. Kod ovih materijala, lek se najpre oslobađa sa površine (što uzrokuje visok efekat naglog otpuštanja), a zatim počinje da difunduje iz unutrašnjosti implantata, preko pora, ka spoljašnjoj sredini. I pored činjenice da ovi polimeri imaju mogućnost bubrenja u vodenoj sredini, tako da pružaju mogućnost vodi da dopre do unutrašnjosti materijala, pokazano je da veliki procenat leka nema mogućnost da bude otpušten tako da trajno ostaje u materijalu. Jedno od predloženih rešenja bila je izgradnja materijala visokog stepena poroznosti, međutim u tom slučaju stepen kontrole nad procesom otpuštanja leka bio je minimalan a rezultat toga bila je velika brzina otpuštanja leka. Kao materijali koji se ne razgrađuju, oni moraju biti uklonjeni iz organizma nakon terapije zbog opasnosti da posle izvesnog vremena i sami postanu izvor infekcije (neki rezultati pokazuju afinitet bakterija ka vezivanju za površinu implantata sa ili bez antibiotika) i/ili da izazovu reakciju imunog sistema, odnosno da ih organizam prepozna kao strano telo.<sup>[113],[116]</sup>
- (b) Biodegradabilni polimeri. Ova vrsta polimera je u stanju da prevaziđe sve poteškoće koje su vezane za primenu nedegradabilnih. Ipak njihova primena uvodi novu vrstu problema. Većinu ovih polimera karakteriše hidrolitička degradacija u vodenoj sredini. Rezultat ovog procesa je povećanje koncentracije protona. Lokalno povećanje kiselosti koje nastupa u toku degradacije ovih polimera, može da izazove iritaciju i konačno infekciju okolnog tkiva. Pojava infekcije može da pokrene reakciju imunog sistema usled čega postoji opasnost da implantat bude odbačen. Primena supstanci koje bi bile modifikatori pH je potencijalno rešenje.<sup>[116]</sup>
2. *Izbor antibiotika.* Kao što je već napomenuto, infekcijske bolesti koštanog tkiva mogu biti izazvane velikim brojem različitih bakterija koje odlikuje različita osetljivost na antibiotike. U skladu sa tim, izbor antibiotika koji bi bio adekvatan za inkapsulaciju u okviru implantata je prilično komplikovan korak. Pored toga, izabrani antibiotik bi morala odlikovati takva vrsta stabilnosti da se on ne sme menjati u toku procesa inkapsulacije kao ni u toku procesa otpuštanja. U suprotnom, terapijski učinak ovog leka bi mogao biti smanjen ili potpuno eliminisan.<sup>[113],[116],[117]</sup>

3. *Kinetika otpuštanja antibiotika.* Primećen je razvoj rezistentnosti nakon primene nekih antibiotika (najčešće gentamicina) u okviru implantata. Dobro je poznato da je za efektivnu profilaksu ili lečenje infekcije neophodna dovoljno visoka koncentracija antibiotika. To podrazumeva da bi materijal za izgradnju implantata morao da bude dizajniran na taj način da može da obezbedi dovoljno visoku koncentraciju leka na mestu infekcije. Iz tog razloga neophodna je detaljna i precizna analiza kinetike otpuštanja leka. Pored toga, količina leka koja se otpusti morala bi da omogući potpuno izlečenje jer u suprotnom postoji opasnost od razvoja rezistentnih vrsta tako da je neophodna primena drugog antibiotika.<sup>[113],[117]</sup>
4. *Mehaničke karakteristike implantata.* Inkapsulacija medikamenta u okviru materijala koji se koriste za izgradnju ortopedskih implantata (kukova, zglobova i sl.) može uticati na kvalitet njihovih mehaničkih karakteristika. Ove karakteristike su za funkcionalnost ove vrste implantata od velikog interesa. Novi način dizajna kao što je oblaganje već formiranih implantata dodatnim materijalom koji bi bio nosač leka, ili upotreba materijala sa lekom u vidu punilaca malih koštanih defekata su potencijalno rešenje.<sup>[116]</sup>
5. *Ekonomski faktor.* Poređenjem cena trenutno dostupnih antibiotika u odnosu na cenu koja je predviđena za implantate sa inkapsuliranim antibiotikom, razlika je prilično velika. Problem je moguće rešiti najpre primenom jeftinijih sirovina kao i razvojem metoda za procesiranje ovih materijala koje bi bile ekonomski isplativije. Sa druge strane, dizajniranjem ovih materijala na način koji bi omogućio prevazilaženje poteškoća vezanih za njihovu primenu i značajno povećanje kvaliteta lečenja, pružili bi mogućnost za kompenzaciju razlike u ceni.<sup>[113],[116]</sup>

## 1.5. MATERIJALI ZA KONTROLISANU DOSTAVU ANTIBIOTIKA

---

Izbor materijala koji će imati funkciju nosača medikamenta je jednako važan kao i izbor antibiotika koji će u okviru ovog materijala biti inkapsuliran. Terapijski učinak rezultujućeg implantata za lokalnu, kontrolisanu dostavu antibiotika zavisice od oba izbora podjednako.

### 1.5.1. IZBOR ANTIBIOTIKA I UTICAJ SVOJSTAVA LEKA NA PROCESE INKAPSULACIJE I OTPUŠTANJA

---

#### ***Izbor antibiotika***

Prilikom izbora antibiotika koji će se koristiti za inkapsulaciju u okviru materijala-nosača prvi kriterijum su spektar antibakterijskog dejstva i alergijska reakcija.<sup>[113]</sup>

I pored veoma širokog spektra dejstva, usled učestalih alergijskih reakcija koje se mogu javiti u bilo kom starosnom dobu i nezavisno od alergijske istorije osobe, antibiotici iz grupe penicilina, i pored toga što su razmatrani kao mogući kandidati,<sup>[118]</sup> apsolutno su neprihvatljivi za ovu namenu.

***Aminoglikozidi.*** Aminoglikozidni antibiotici su prvobitno izabrani kao materijali sa baktericidnim delovanjem namenjeni za inkapsulaciju u okviru nosača koji se koriste za izradu implantata za rekonstrukciju i reparaciju koštanog tkiva.<sup>[119],[120]</sup> Izbor ove grupe antibiotika prvenstveno se odnosi na širok spektar bakterija koje su osetljive na njih kao i na zadovoljavajući alergijski profil. Najznačajniji predstavnici grupe aminoglikozidnih antibiotika koji se danas koriste za inkapsulaciju u okviru materijala za izgradnju implantata su gentamicin i tobramicin.<sup>[121],[122],[123]</sup> Treba pomenuti i to da se ova dva antibiotika koriste u praksi za komercijalnu pripremu koštanog cementa sa inkapsuliranim antibiotikom. Količina ovih lekova u komercijalnim implantatima je niska i namenjena je za preventivne svrhe. Za ovu grupu antibiotika je značajno da pokazuju visok nivo efikasnosti protiv stafilikoka koje su glavni uzročnici infekcije koštanog tkiva, kao i to da su efikasni i protiv metacilin-rezistentnih bakterijskih vrsta. Jedan od ozbiljnih nedostataka koji je zapažen kod inkapsulacije gentamicina i tobramicina u okviru koštanog cementa je pojava rezistentnosti. Zapaženi su slučajevi razvoja rezistentnih vrsta bakterija na implantatima koji sadrže ove antibiotike ili na mestu na



kom je implantat sa inkapsuliranim gentamicinom i/ili tobramicinom bio postavljen zbog kojih je on bio odbačen usled čega je ponovna implantacija bila neophodna.<sup>[113],[117]</sup>

**Glikopeptidi.** Ova grupa antibiotika se najčešće razmatra kao zamena za aminoglikozidne antibiotike u toku izbora leka koji će biti inkapsuliran. Razvoj rezistentnih vrsta koji se zapaža kod sve većeg broja ljudi sa ugrađenim implantatima koji sadrže gentamicin i tobramicin je osnovni razlog zbog koga se razmišlja o primeni vankomicina, predstavnika glikopeptida, kao njihove zamene.<sup>[124],[125]</sup> Ipak, efikasnost koja se postiže ovim lekom je, u odnosu na jednake koncentracije gentamicina i tobramicina, znatno niža.<sup>[113]</sup>

**Cefalosporini.** Treća grupa antibiotika koja se razmatra za inkapsulaciju u okviru koštanog cementa su cefalosporini.<sup>[126],[127]</sup> Pozitivna strana ovih antibiotika je u tome što oni do sada pokazuju veoma dobre rezultate kada su u pitanju istraživanja u cilju profilaktičke namene i u skladu sa literaturom do sada nije bilo prijavljenih slučajeva alergijske reakcije u toku ovog vida primene. Međutim, neophodno je istaći da ova grupa antibiotika nije efikasna protiv metacilin-rezistentnih organizama. Istraživanja koja su vršena u cilju identifikacije vrste bakterija koje su najčešće odgovorne za infekcije uzrokovane implantacijom pokazala su oko 69% slučajeva izazvanih stafilokokama. Ispostavilo se da je svega 52% ovih bakterija osetljivo na cefuroksim koji je pripadnik druge generacije cefalosporina.<sup>[113],[128]</sup>

**Linkozamidi.** Grupa linkozamidnih antibiotika je zanimljiva za proces inkapsulacije u okviru nosača za lokalnu dostavu u okviru koštanog tkiva. Ova grupa antibiotika nema široki spektar antibakterijske aktivnosti, ali su lekovi koji joj pripadaju dizajnirani tako da najefikasnije dejstvo imaju protiv svih vrsta aerobnih koka (*Streptococcus* i *Staphylococcus*) koje su najčešći izazivači infekcijskih bolesti koštanog tkiva kao i da su izuzetno efikasni protiv metacilin-rezistentnih patogena.<sup>[129]</sup> Sa stanovišta sigurnosti i alergijskih reakcija, ovi lekovi su pouzdani i pripadaju grupi antibiotika koji se primenjuju kod dece i trudnica. Najvažniji predstavnici ove grupe su linkomicin i klindamicin. Materijali dobijeni nakon inkapsulacije ove vrste antibiotika u okviru različitih nosača predviđeni su za lokalnu primenu putem kože,<sup>[129],[130]</sup> za peridentalnu primenu<sup>[131]</sup>, za izgradnju implantata<sup>[124]</sup> i koštanih punilaca.<sup>[23]</sup> Prakična primena ove

grupe lekova je u fazi istraživanja zbog potrebe za odgovarajućim načinom inkapsulacije i optimizacijom kinetike otpuštanja.

### ***Uticao svojstava leka na procese inkapsulacije i otpuštanja***

Nakon izbora antibiotika na osnovu antibakterijskog dejstva i dosadašnjeg iskustva koje je on pokazao u praksi, neophodno je optimizovati metodu koja će omogućiti njegovu inkapsulaciju u okviru predviđenog nosača leka. Karakteristike antibiotika koje su važne i koje je neophodno poznavati neposredno pre početka optimizacije procesa inkapsulacije su: molekulska masa, rastvorljivost u vodi i organskim rastvaračima, kiselost i termička stabilnost.<sup>[110]</sup> Ove fizičko-hemijske karakteristike nekih od antibiotika koji su do sada korišćeni za inkapsulaciju u okviru nosača zajedno sa kratkim opisom njihovog spektra antibakterijskog dejstva sumirani su u tabeli 1.1.<sup>[132],[133]</sup>

***Rastvorljivost*** leka koji se inkapsulira u okviru određenog nosača je izuzetno važan faktor koji utiče kako na proces inkapsulacije tako i na proces otpuštanja. U zavisnosti od rastvorljivosti leka u izabranim rastvaračima koji se koriste u toku procesiranja, različita je mogućnost za njegovu inkapsulaciju.<sup>[140]</sup> To se prvenstveno odnosi na različitu mogućnost za postizanje određenog nivoa efikasnosti inkapsulacije i prevazilaženje problema adsorpcije leka za spoljašnju površinu nosača koji posledično doprinose visokom efektu naglog inicijalnog otpuštanja. Pored uticaja na pojavu efekta naglog otpuštanja, rastvorljivost leka ima uticaja i na kinetiku otpuštanja.<sup>[141]</sup> To svojstvo prvenstveno je vezano za difuzioni koeficijent i pokretljivost leka kroz matricu u okviru koje je inkapsuliran. Pokazano je da rastvorljivost leka predstavlja pokretačku silu za njegovo otpuštanje<sup>[142]</sup> od koje zavisi da li će se lek otpuštati brže ili sporije u određenom okruženju. Neki od primera koji ilustruju ovaj efekat su otpuštanje dva različita leka sa drastično različitom rastvorljivošću u vodi (rodamin (8 mg/ml) i piroksikam (manje od 100 µg/ml))<sup>[141]</sup> ili otpuštanje dve različite forme jednog istog leka koje odlikuje različita rastvorljivost u vodi (klindamicin baza (0.5 mg/ml) i klindamicin-fosfat (više od 150mg/ml))<sup>[143]</sup>.

Tabela 1.1: Svojstva pojedinih antibiotika koji su do sada primenjeni za inkapsulaciju u cilju kontrolisane dostave.<sup>[132],[133]</sup>

Klasa/lek	Molekulska masa (g/mol)	Rastvorljivost u vodi (mg/ml)	pH okruženja	Rastvorljivost u organskim rastvaračima <sup>1</sup>	Temperatura topljenja (°C)	Antibakterijski spektar
Aminoglikozidi <sup>[119],[120]</sup>			Bazno			Širok spektar, aktivni protiv mnogih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija
<i>Amikacin</i>	585.6	185		Nerastvoran	220-230	
<i>Gentamicin</i>	477.6	100		DMF, MeOH, EtOH, etar, CHCl <sub>3</sub> , AcOH, DMSO	102-108	
<i>Tobramicin</i>	467.5	538			168	
Cefalosporini <sup>[126],[127]</sup>			Slabo kiselo			Uglavnom aktivni protiv Gram pozitivnih bakterija, prošireno dejstvo i na neke Gram negativne
<i>Cefazolin</i>	454.5	0.487		DMF, AcOH, EtOH, MeOH	198-200	
<i>Cefaloperazon</i>	645.7	0.286		MeOH	169-171	
Glikopeptidi <sup>[124],[125]</sup>			Amfotern			Aktivni uglavnom protiv Gram-pozitivnih bakterija, mikobakterija
<i>Vankomicin</i>	1449.3	100		DMSO	185-188	
Linkozamidj <sup>[23], [124]</sup>						Efikasni protiv Gram pozitivnih bakterija, prošireno dejstvo protiv Gram negativnih bakterija
<i>Linkomicin</i>	443 (hidrohlorid)	50 (hidrohlorid)	Kiselo	DMF, AcOH	156-158	
<i>Klindamicin</i>	425.2 (baza) 505.1 (fosfat)	150 (fosfat) 0.5 (baza)	Slabo kiselo	AcNC, EtOH (slabo)	218-255	
Makrolidi <sup>[134]</sup>			Slabo bazno			Aktivni protiv Gram-pozitivnih i <i>fastidious</i> Gram-negativnih bakterija
<i>Eritromicin</i>	733.9	1.44		MeOH, EtOH, AcOH, ACN, CHCl <sub>3</sub> , EtOAc, DMF, DMSO	191	
Nitromidazoli			Lipofilni, slabo disosuju			Aktivni protiv većine anaeroba

<sup>1</sup> Skraćenice naziva organskih ratvarača: DMF- dimetil-formamid, MeOH- metanol, EtOH- etanol, AcOH- aceton, DMSO- dimetil-sulfoksid, AcCN- acetonitril, EtOAc- etil-acetat.

<i>Metronidazol</i>	171.2	10	EtOH, CHCl <sub>3</sub>	158-160	
Penicilini <sup>[118]</sup>		kiselu			Gram-pozitivne i neke Gram-negativne bakterije
<i>Ampicilin</i>	349.4	10.1	MeOH, DMF, EtOH, AcOH, DMF, DMSO, CHCl <sub>3</sub>	199-202	
Polipeptidi <sup>[135]</sup>		Bazno			Uglavnom Gram-negativne bakterije
<i>Kolistin (polimiksin E)</i>	1155.4	564	MeOH, DMF, DMSO	200-220	
Kvinoloni <sup>[136],[137]</sup>		Amfoterno			Širok spektar, Efikasni protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.
<i>Ciprofloksacin</i>	331.4	0.001	MeOH, DMF, DMSO	255-257	
<i>Ofloksacin</i>	361.4	28.3	CHCl <sub>3</sub> , EtOH, MeOH	250-257	
Rifamicini <sup>[138]</sup>		Lipofilni, slabo disosuju			Aktivni protiv Gram-pozitivnih i <i>fastidious</i> Gram-negativnih bakterija
<i>Rifampin (Rifampicin)</i>	823.0	1.4	DMSO, CHCl <sub>3</sub> , THF, AcOH	183-188	
Tetraciklini <sup>[139]</sup>		Amfoterni			Aktivni protiv Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija,
<i>Doksiciklin</i>	444.5	0.63	MeOH, DMF	201	
<i>Minociklin</i>	457.5	52	EtOH, EtOAc, AcOH, MeOH,	n. a.	
<i>Tetraciklin</i>	444.5	0.23	EtOH, DMF, CHCl <sub>3</sub>	165	

**Molekulska masa** molekula leka koji se inkapsulira je veoma važna za efikasnost ovog procesa. Ovo je faktor koji značajno utiče i na proces otpuštanja. Efekat naglog otpuštanja leka specifičan je i za molekule niskih molekulskih masa kao i za peptide i proteine. Međutim način na koji se on ispoljava potpuno je različit. Kod molekula niskih molekulskih masa, pojava efekta naglog otpuštanja prvenstveno se vezuje za visoku mobilnost usled veće rastvorljivosti ili veće sposobnosti da prođu kroz vrlo male pore na nosaču pre nego što njegova degradacija otpočne. Sa druge strane, kod makromolekula ova pojava vezana je za nepotpunost inkapsulacije u toku koje su lanci ovih velikih molekula adsorbovani za površinu nosača sa koje se inicijalno desorbuju u momentu kada se materijal nađe u tečnom medijumu.<sup>[144],[145]</sup> Neki od primera koji ilustruju efekat molekulske mase odnose se na inkapsulaciju i uporednu analizu mehanizma otpuštanja natrijum-salicilata i albumina<sup>[145]</sup> kao i na analizu kinetike otpuštanja vitamina. <sup>[20],[146]</sup>

### 1.5.2. MATERIJALI ZA FORMIRANJE NOSAČA ANTIBIOTIKA

---

Prilikom dizajniranja implantata izbor materijala nosača odgovarajućeg antibiotika prvenstveno zavisi od toga za koju namenu je implantat predviđen što će dalje određivati način njegovog procesiranja i optimalnu dozu antibiotika koju bi trebao da sadrži.

Materijali u okviru kojih je inkapsuliran antibiotik mogu se primenjivati za različite namene kao što su:

**1. *Mišićno-skeletni i ortopedski implantati kod kojih se ovi materijali koriste za:***

- (a) Formiranje cementa ili punilaca sa inkapsuliranim antibiotikom*
- (b) Formiranje obloge implantata sa inkapsuliranim antibiotikom*
- (c) Formiranje bioresorbibilnih filmova sa inkapsuliranim antibiotikom.*

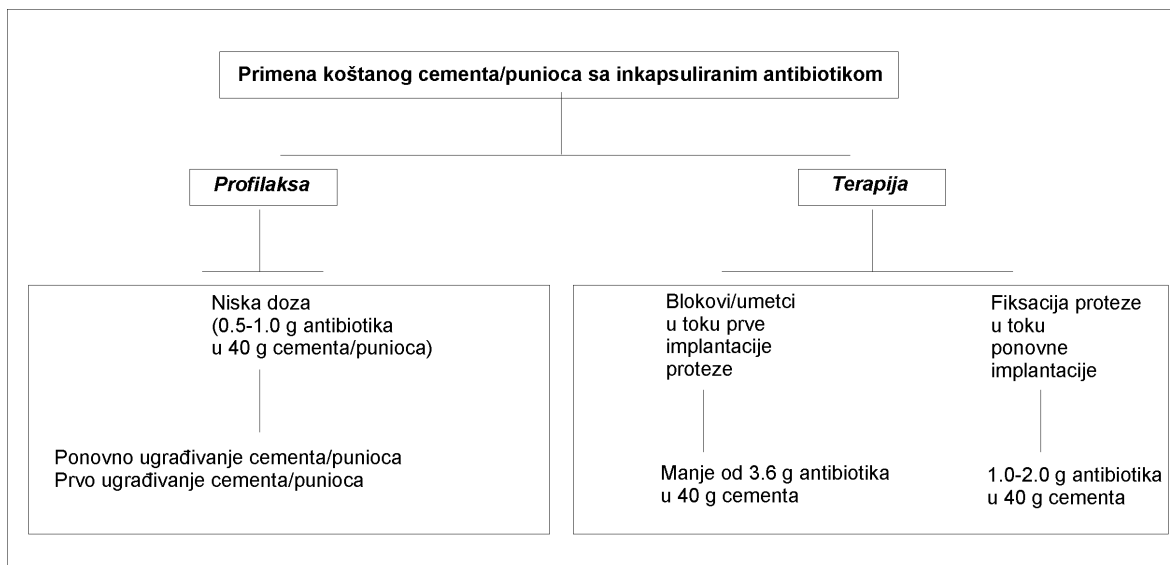
**2. *Obloge rana (kod otvorenih preloma na primer)***

- (a) Obloge rana zasnovane na sintetskim polimerima*
- (b) Obloge rana zasnovane na prirodnim polimerima*
- (c) Kompozitna vlakna sa antibakterijskim svojstvima*

**3. *Peridentalni implantati***

- (a) Nedegradabilni implantati*
- (b) Degradabilni implantati <sup>[110]</sup>*

Primena ovih implantata može biti terapijska ili profilaktička. Na slici 1.14 prikazana je opšta shema koja se odnosi na način formiranja cementa i punilaca sa inkapsuliranim gentamicinom i tobramicinom koji se danas primenjuje u praksi.



**Slika 1.14.** Shema za formiranje materijala sa gentamicinom i tobramicinom u zavisnosti od namene koja se primenjuje u praksi.<sup>[113]</sup>

Generalno, materijali koji se koriste za formiranje nosača u okviru kojih je inkapsuliran antibiotik mogu se podeliti na:

1. Polimerne (biodegradabilne i bionedegradabilne)
2. Biokeramičke
3. Kompozitne (keramika/keramika, polimer/keramika, polimer/polimer)

#### 1.5.2.1. POLIMERNI MATERIJALI KAO NOSAČI ANTIBIOTIKA

Polimerni materijali su jedni od prvih koji su primenjeni kao nosači antibiotika i prvi koji su dobili dozvolu za praktičnu primenu i komercijalnu prodaju. Na osnovu mogućnosti degradacije u fiziološkim uslovima mogu se podeliti na bionedegradabilne i biodegradabilne. Prema poreklu, klasifikuju se na prirodne i sintetske.

**Bionedegradabilni polimeri.** Poznati su „rezervoari” antibiotika koji se iz njih otpušta desorbovanjem sa površine i difuzijom iz zapremine. Ovakav način otpuštanja leka izuzetno je zavistan od poroznosti, specifične površine i hrapavosti površine materijala. [11] Prvi nedegradabilni polimeri koji su testirani za kontrolisanu dostavu antibiotika su poli(etilen-vinil-acetat) (PEVA), silikoni (poli(dimetil-siloksan)) (PDMS)) i poli(metil-metakrilat)(PMMA). PEVA sa inkapsuliranim klindamicinom je konstruisan kao materijal za

peridentalnu terapiju u vidu antibiotskih vlakana koja bi bila ugrađena u okviru zubne šupljine u cilju lečenja ili prevencije razvoja zubnih infekcija.<sup>[147],[148]</sup> PDMS (sa inkapsuliranim tobramicinom)<sup>[1]</sup> i PMMA (sa inkapsuliranim gentamicinom) konstruisani su za primenu u izgradnji cementa i punilaca<sup>[136]</sup>. PMMA treba naročito istaći kada je u pitanju ova grupa polimera upravo iz tog razloga što on predstavlja prvi polimer koji je odobren za kliničku primenu u lečenju osteomijelitisa. Danas postoji veliki broj komercijalnih proizvoda kao što su Simplex P (PMMA/eritromicin),<sup>[1]</sup> Stryker (PMMA/tobramicin), Palacos (PMMA/gentamicin) i Septopal (PMMA/gentamicin) koji su dostupni na tržištu u Evropi i Simplex PT (PMMA/tobramicin) koji je prvi i jedini zastupljen na tržištu u Sjedinjenim Državama.<sup>[136]</sup> Ovi materijali su pokazali dobre osobine prilikom *in vivo* aplikacije. Međutim prvi rezultati koji su se odnosili na razvoj rezistentnih vrsta ukazivali su na određene nedostatke. Osnovni nedostaci ove vrste materijala odnose se na nizak nivo leka koji može biti inkapsuliran kao i još niži nivo leka koji može biti oslobođen (kod PMMA manje od 50% leka biva oslobođeno u periodu od četiri nedelje nakon čega oslobađanje potpuno prestaje) kao i visok efekat naglog otpuštanja (koji može izazvati toksično visok nivo leka u plazmi) a koji se javlja usled nedovoljno kontrolisane mikrostrukture materijala (pukotina na površini). Toksičnost koja je primećena kod ove vrste polimera vezuje se za proces polimerizacije kojim se dobijaju, nakon koga zaostali monomeri mogu da inaktiviraju antibiotik i da izazovu nekrozu okolnog koštanog tkiva. Glavni nedostatak ovakve vrste implantirajućih materijala je dodatna hirurška intervencija koja podrazumeva njihovu uklanjanje iz organizma. PMMA ima manji afinitet ka vezivanju za koštano tkivo, dok sa druge strane meko tkivo ima svojstvo da se vezuje za površinu ovog materijala kao i da se ugrađuje unutar njega, što dodatno komplikuje njegovo uklanjanje iz organizma nakon što je period lečenja završen.<sup>[136]</sup>

**Biodegradabilni polimeri.** Ova grupa polimera privlači veliku pažnju kada je u pitanju inkapsulacija antibiotika prvenstveno jer pružaju mogućnost za prevazilaženje poteškoća koje su uočene kod PMMA. Neke od prednosti ovih polimera su: (a) kontrolisana brzina razgradnje u organizmu koja ne zahteva hiruršku intervenciju radi uklanjanja implantata čime se eliminiše i potreba za rekonstrukcijom okolnog mekog tkiva, (b) veći kapacitet za inkapsulaciju leka koji se postepeno otpušta sve dok sva količina leka koja je inkapsulirana ne bude otpuštena i (c) otpuštanje leka koje zavisi od degradacije tako da se modifikovanjem biodegradabilnosti može postići otpuštanje u toku različitih vremenskih intervala što pruža

moгуćnost lećenja infekcija sa različitim vremenom trajanja. Obzirom na to da su biodegradabilni, izbor ovih polimera prvenstveno je vezan za karakteristike njihove degradacije od kojih će zavisiti njihova biokompatibilnost. To podrazumeva razmatranje: (a) netoksičnosti produkata degradacije, (b) mogućnosti za kontrolisanu degradaciju u fiziološkim uslovima i (c) promena površinskih karakteristika u toku procesa degradacije.<sup>[1],[149]</sup>

*Prirodni biodegradabilni polimeri* su izuzetno značajni sa stanovišta kontrolisane dostave najpre zbog netoksičnosti, odličnih površinskih karakteristika i veoma visokog stepena biokompatibilnosti. Neki od glavnih predstavnika ovih polimera koji se koriste u dostavi antibiotika su: poli(hidroksi-alkanoati) (poli(3-hidroksibutirat-ko-hidroksivalerat) (PHBV)),<sup>[150],[136]</sup> citosan<sup>[151]</sup> i kolagen.<sup>[152]</sup> Citosan je zanimljiv iz tog razloga jer ovaj biopolimer ima bakteriostatsko dejstvo.<sup>[151]</sup> Sa druge strane, kolagen, kao najzastupljeniji biopolimer organskog dela koštanog tkiva, ima sposobnost da bude enzimski degradiran što omogućava visok stepen kontrole nad otpuštenim lekom.<sup>[152]</sup>

*Sintetski biodegradabilni polimeri* koji se istražuju kao potencijalni nosači antibiotika formirani za primenu u oblaganju implantata, kao bioresorbilni filmovi sa antibakterijskim svojstvima ili kao antibakterijske obloge rana su: poli(fumarati),<sup>[153],[154],[155]</sup> poli(karbonati),<sup>[156]</sup> poli( $\epsilon$ -kapolakton)<sup>[157]</sup>, poli(alkil-cijano-akrilati) (AAC)<sup>[149]</sup> i poli( $\alpha$ -hidroksi kiseline).<sup>[11],[136]</sup>

Poli(fumarati) su relativno nova grupa biodegradabilnih polimera zasnovana na fumarnoj kiselini i njenim solima koji predstavljaju prirodne, netoksične produkte humanog metabolizma. Neki od glavnih predstavnika ove grupe polimera su: poli(propilen-fumarat), poli(propilen-fumarat-ko-etilen-glikol), i oligo(poli(etilen-glikol)-fumarat)).<sup>[153]</sup> Ovi polimeri imaju svojstvo da mogu biti aplicirani u vidu tečnosti nakon čega se *in situ* umrežavaju i formiraju polimernu mrežu. Pored biodegradabilnosti i lakog načina aplikacije, ove polimere odlikuje i izuzetno lak način modifikacije tako da su veoma pogodni za primenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Poli(propilen-fumarat)-metilmetakrilat sa inkapsuliranim vankomicinom i gentamicinom je pripadnik ove grupe polimera predviđen za formiranje koštanog cementa koji bi se primenjivao i u lećenju hroničnog osteomijelitisa. Dosadašnje analize su pokazale da se nakon implantacije ovog materijala postiže znatno veća koncentracija inkapsuliranog leka



u odnosu na PMMA, otpušta se celokupna količina leka usled biodegradabilnosti, a mehaničke karakteristike ostaju zadovoljavajuće nakon inkapsulacije do 3% leka.<sup>[154],[155]</sup>

Jedan od najznačajnijih predstavnika poli(karbonata) je poli(trimetilen-karbonat) (PTMC), koji je razmatran kao polimerni materijal- nosač antibiotika (gentamicina). Ovo je izuzetno zanimljiv polimer sa stanovišta tkivnog inženjerstva i kontrolisane dostave medikamenata koji se u literaturi često navodi kao polimer sa superiornijim karakteristikama u odnosu na široko primenjene poli( $\alpha$ -hidroksi kiseline). Ovaj biodegradabilni polimer odlikuje enzimska razgradnja u *in vivo* uslovima i njegovi produkti razgradnje nisu kiseli. Upravo je to jedan od razloga zbog kog do sada nisu registrovani primeri iritacije i infekcije tkiva nakon njegove primene. Obzirom na to da se razgrađuje enzimski, mehanizam degradacije ovog polimera je postepena površinska erozija koja može da obezbedi veliki nivo kontrole nad koncentracijom otpuštenog leka.<sup>[156]</sup>

#### POLI(D,L-LAKTID-KO-GLIKOLID) KAO NOSAČ ANTIBIOTIKA

---

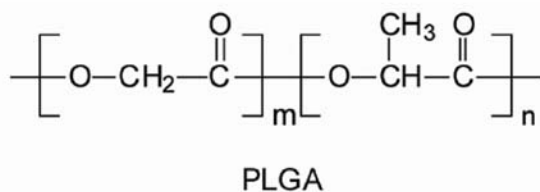
Najveći broj istraživanja vezanih za inkapsulaciju antibiotika u okviru biodegradabilnih polimera odnosi se na poli( $\alpha$ -hidroksi kiseline) (poli(laktid) (PLA), poli(glikolid) (PGA) i PLGA). Oni pripadaju grupi sintetskih, biodegradabilnih, termoplastičnih alifatičnih poliestara dobre biokompatibilnosti. <sup>[14]</sup>

Ova grupa polimera pripada jednoj od retkih grupa sintetskih polimera koji su odobreni od strane Agencije za hranu i lekove za kliničku primenu. <sup>[19]</sup> U skladu sa tim, mnogi produkti koji su danas dostupni na tržištu sadrže ove polimere kao nosače koji omogućavaju kontrolisanu dostavu bioaktivnih supstanci primenljivih u različitim oblastima biomedicine.<sup>[152]</sup> Jedan od primera je i primena implantata izgrađenih za lečenje osteomijelitisa. Ortopedski implantati mogu sadržati ove polimere u vidu lokalizovanih umetaka, punilaca koji sadrže mikro- ili nanosferne čestice, topljenjem ili suspendovanjem nanete površinske obloge ili filmove.<sup>[158],[159],[160]</sup>

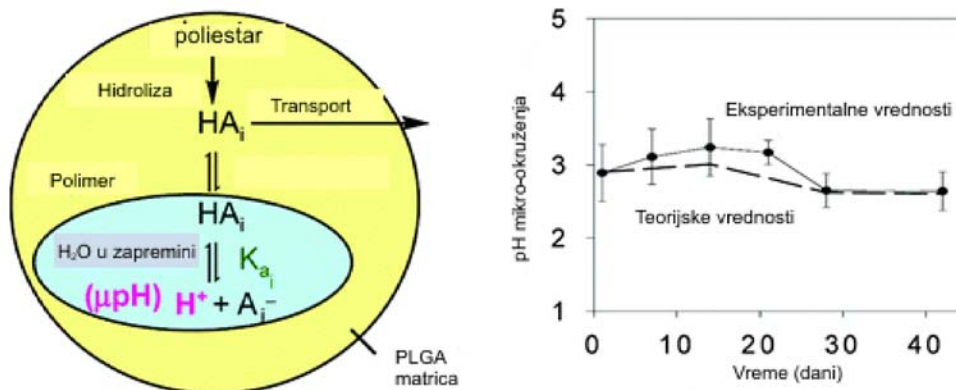
Različite su mogućnosti za formulisanje ovih materijala u vidu nosača antibakterijske supstance koju će otpuštati na kontrolisani način čime će omogućiti sprečavanje nastanka i/ili razvoja koštane infekcije.<sup>[161][162],[173]</sup> Primer primene ovih polimera u vidu punilaca- nosača antibiotika je slojevita struktura PLA i PLGA (sa različitim ko-monomernim udelom) kao nosača klindamicina koja omogućava konstantno otpuštanje leka u toku 10 dana. <sup>[124]</sup> PLGA

polimer kao nosač gentamicina formulisan je u vidu obloga ortopedskih implantata sposobnih da otpuštaju lek u toku 24 dana u koncentracijama koje su iznad minimalne inhibitorne doze čime je postignut dovoljno visok antibakterijski efekat da se ovaj materijal može preporučiti kao sredstvo za oblaganje implantata kod otvorenih preloma.<sup>[120]</sup> PLGA sa inkapsuliranim fluorokvilonima (ciprofloksacinom i pefloksacinom) formulisan je kao umetak cilindričnog oblika koji je takođe pokazuje visok stepen antibakterijskog dejstva i pruža mogućnost izbora kinetike otpuštanja u zavisnosti od molarne mase polimernih lanaca koji su sintetisani uporedo sa procesom inkapsulacije leka.<sup>[137]</sup> Do sada navedeni primeri PLGA sa antibiotikom bili su optimalni za preventivnu primenu protiv infekcijskih bolesti koštanog tkiva. Neki od primera PLGA sa inkapsuliranim antibiotikom koji su predviđeni za terapijske svrhe su PLGA(50:50)/tobramicin (5 i 10mas.%)<sup>[123]</sup> i PLGA(50:50)/gentamicin<sup>[119]</sup> koji su formulisani u vidu praha i namenjeni kao punioci. Ovi materijali sadrže mikročestice koje imaju mogućnost da otpuštaju antibiotik u periodu dužem od 4 nedelje u dozama koje su dovoljne za terapijske svrhe.

(a)



(b)



**Slika 1.15.:** Strukturna formula PLGA polimera sa udelom laktidne i glikolidne komponente m:n (a); ilustracija zapreminske degradacije PLGA i lokalnog povećanja kiselosti (b).<sup>[164]</sup>

Izuzetno važno svojstvo ove grupe polimera je mogućnost za dizajniranje vremena degradacije u *in vivo* uslovima od par nedelja do par godina.<sup>[141]</sup> Na slici 1.15a prikazana je strukturna formula PLGA polimera koji sadrži  $m$  laktidnih i  $n$  glikolidnih ko-monomernih jedinica čiji odnos značajno utiče na degradaciju ovog polimera. Istraživanja koja su urađena u cilju *in vitro* i *in vivo* analize koštanih implantata koji sadrže ove polimere sa inkapsuliranim antibiotikom pokazala su da kinetika njihove degradacije kao i kinetika otpuštanja leka zavise od faktora kao što su: hemijska arhitektura (komonomerni sastav, odnosno udeo laktidnih i glikolidnih monomernih jedinica, srednja molarna masa, dužina lanaca), hemijska struktura (vezane ili nevezane terminalne grupe), morfologija i struktura (kristaliničnost, oblik, veličina čestica), maseni udeo leka u polimeru i veličina umetka, medijum (simulirana telesna tečnost, digestivni fluid) i način procesiranja.<sup>[136],[163]</sup>

Finalni produkti degradacije ovih polimera su laktidna i glikolidna kiselina koje su prirodni, netoksični produkti metabolizma koji se putem Krebs-ovog ciklusa izlučuju iz organizma. To je osnovni razlog zbog kog se ovi polimeri smatraju sigurnim za humanu primenu. Ipak mehanizam degradacije ovih polimera upućuje na njihov prvi nedostatak. Treba naglasiti da proces degradacije poliestara uključuje hidrolizu.<sup>[165]</sup> Ona se odnosi na kidanje polimernih lanaca u prisustvu vode (fiziološkim uslovima) usled čega nastaju kiseli produkti- polialkoholi i polikiseline. Kako je difuzija tečnosti (vode) unutar polimernih čestica brži proces u odnosu na brzinu hidrolize estara, dešava se zapreminska degradacija. Usled koncentracijskog gradijenta, produkti degradacije difunduju iz zapremine čestica ka spoljašnjoj sredini gde bivaju neutralizovani. U isto vreme bazne komponente iz okruženja ulaze unutar zapremine čestica čime neutralizuju nastale kisele produkte unutar njih. Sa druge strane, prisustvo kiselih komponenti- produkata degradacije u zapremini u mogućnosti je da inicira autokatalitičku degradaciju, uzrokujući sve veću brzinu hidrolize estarskih veza. Kako su difuzioni procesi relativno spori i zavise od srednjeg puta difuzije i mobilnosti nastalih vrsta, brzina kojom se kiseli produkti stvaraju je veća u odnosu na brzinu njihove neutralizacije. Rezultat toga je lokalno povećanje kiselosti okruženja.<sup>[142]</sup> Ovaj efekat ilustrovan je na slici 1.15b. Pokazalo se da lokalno povećanje pH izaziva iritaciju tkiva i može da aktivira odgovor imunog sistema što izaziva odbacivanje implantata i resorbovanje odnosno gubitak koštane mase.<sup>[166],[167],[168]</sup> Iz tog razloga postoji velika potreba za rešavanjem problema kiselosti kako bi primena ovog polimera u lokalnoj dostavi lekova bila sigurna.<sup>[169]</sup>

Sa stanovišta površinskih karakteristika, ovi polimeri poseduju veoma slabu hidrofilnost<sup>[170]</sup> što je njihov drugi veliki nedostatak kada je u pitanju lokalna dostava.<sup>[171]</sup> Pokazalo se da hidrofobni polimeri imaju veoma lošu interakciju sa okolnim tkivom, jer ćelije nemaju afinitet da se za njih vezuju. Jedno od rešenja je površinska modifikacija kao u slučaju blok-kopolimera sa poli(etilen-glikolom) odnosno PLGA-PEG-a. Hidrofilni karakter i mogućnost bubrenja PEG-a doprineli su poboljšanju karakteristika ovog nosača antibiotika.<sup>[172],[173]</sup>

#### 1.5.2.2. BOKERAMIČKI MATERIJALI KAO NOSAČI ANTIBIOTIKA

---

Biodegradabilni i bioresorbilni keramički materijali se dugo koriste kao sistemi za dostavu medikamenata i do sada su primenjeni za dostavu najrazličitijih vrsta lekova počev od proteina, peptida, steroida, aminokiselina do faktora rasta, vakcina i antibiotika.

**Kalcijum-sulfat** ( $\text{CaSO}_4$ ). Biokeramički materijal koji odlikuje osteokonduktivnost. U rekonstruktivnoj medicini se primenjuje u vidu poroznih (*eng. „scaffold”*) struktura koje odlikuje biodegradabilnost. Pripada grupi materijala koji su bili jedni od prvih koji su se primenjivali za tretman koštanih defekata. Nakon eksperimentalnih i kliničkih rezultata koji su pokazivali pozitivan efekat ovog materijala kao punioca koji uspešno zamenjuje nekrozom uništeno koštano tkivo, ovaj materijal se danas može naći na tržištu u vidu  $\alpha$ -kalcijum sulfat hemihidrat cilindričnih koštanih umetaka pod nazivom OsteoSet<sup>®</sup>. Kao nosač antibiotika ovaj materijal je prvi put predložen još 1928. godine. Formulisan je kao nosač rivanola i testovi koji su urađeni na psima pokazali su pozitivne rezultate.<sup>[174]</sup> Od tada, korišćen je kao nosač mnogih antibiotika među kojima su tobramicin<sup>[175]</sup> i daptomicin<sup>[176]</sup>. Veliki problem ovog materijala je veoma kratko vreme otpuštanja leka i to u izuzetno visokim koncentracijama. Ovaj problem se uspešno prevazilazi izgradnjom kompozita.

**Kalcijum-fosfatni keramički materijali.** Kao nosači lekova omogućavaju prilično dobru biološku dostupnost, predvidiv terapijski odgovor i unapređenu efikasnost i sigurnost lokalne dostave lekova. Usled biokompatibilnosti, osteokonduktivnosti i osteofilne prirode, biostakla,  $\beta$ -trikalcijum-fosfat ( $\beta$ -TCP) i hidroksiapatit (HAp) pripadnici su ove grupe keramičkih materijala koji se najčešće razmatraju kao materijali primenljivi kao nosači antibiotika.<sup>[1]</sup>

*Biostakla* predstavljaju polikristalnu keramiku koja se dobija kontrolisanom kristalizacijom stakla. U osnovi, predstavljaju silicijum-dioksidne materijale koji mogu biti sa i bez fosfor-

pentoksida. Za primenu u reparaciji i rekonstrukciji koštanog tkiva, razvijene su dve vrste biostakala-  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  i  $\text{Li}_2\text{O-ZnO-SiO}_2$  sistemi.<sup>[177]</sup> U zavisnosti od poroznosti takođe se mogu podeliti u dve grupe: manje poroznu (20-30%) i izrazito poroznu (70%) keramiku. Ovi materijali su se pokazali kao veoma uspešni u tretmanu infekcijskih bolesti koštanog tkiva nastalih nakon ugradnje implantata.<sup>[178]</sup> Uklanjanjem starog i ugrađivanjem novog implantata sa biostaklom i antibiotskom komponentom (cefametazol i izepamicin-sulfat), infekcija je bila izlečena i podstaknuta je osteogeneza i zarastanje implantacijom nastalog koštanog defekta.<sup>[179]</sup>

$\beta$ -trikalcijum-fosfat ( $\beta$ -TCP) se smatra jednim od sintetskih materijala koje odlikuje najbolja biokompatibilnost i bioresorbibilnost. Najčešće se primenjuje kao punilac i vezivo u rešavanju problema koštanih defekata.<sup>[1]</sup> Kao materijal sa takvim karakteristikama, razmatran je i za dostavu antibiotika.<sup>[178]</sup> U slučaju gentamicina i vankomicina otpuštanje lekova je trajalo 10 dana,<sup>[180]</sup> dok je u slučaju ciprofloksacina otpuštanje trajalo znatno duže (42 dana) uz prilično dobar biološki odgovor nakon testiranja *in vivo* na zečevima. Velika brzina resorpcije je ograničenije kada je u pitanju dostava lekova primenom ovog materijala,<sup>[181]</sup> i najčešće se rešava formiranjem kompozita.

### HIDROKSIAPATIT KAO NOSAČ ANTIBIOTIKA

---

Prirodni hidroksiapatit (HAp)-  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ - je glavni sastojak neorganskog dela koštanog tkiva. Po uzoru na njega sintetisani su mnogi materijali koji se zasnivaju na apatitima i mnogi od njih su pokazali svojstva slična prirodnom apatitu kao što su biokompatibilnost, bioaktivnost i bioresorbibilnost. HAp je jedan od materijala koji se najčešće koriste u ortopediji i stomatologiji kako za reparaciju koštanih defekata tako i za izgradnju implantata i formiranje bioaktivnih prevlaka. Zbog slabih mehaničkih karakteristika koje odlikuju sve keramičke materijale, najčešće se primenjuje u vidu kompozita. Ovaj materijal pozitivno utiče na proces izgradnje novog koštanog tkiva i zato predstavlja prirodan izbor kada je u pitanju lokalna, kontrolisana dostava antibiotika.<sup>[135],[174],[182],[183]</sup>

Do sada je više primera pokazalo uspešnost HAp-a kao nosača leka.<sup>[1],[184],[185]</sup> Najviše uspeha su pokazali porozni blokovi HAp-a<sup>[127],[186]</sup> sa 60-68% poroznosti koji su razmatrani sa stanovišta mogućnosti kontrolisane dostave gentamicin-sulfata, natrijum sefaperazona i flomoksefa. Materijal je analiziran *in vitro* i *in vivo* (na pacovima) i rezultati otpuštanja leka su

pokazali da je čak i nakon 12 nedelja koncentracija gentamicina bila pet puta veća od minimalne inhibitorne doze za stafilokoke. Značajno je to da je materijal ostao biokompatibilan a da je antibiotik zadržao antibakterijsko dejstvo i nakon inkapsulacije. Maksimalna koncentracija otpuštenog leka postignuta je prvog dana analiziranog perioda. Zanimljivo je da su blokovi manje poroznosti (50%)<sup>[187]</sup> u slučaju isepamicina pokazivali odloženi period nakon koga je postignuta maksimalna koncentracija otpuštenog leka. Porozni blokovi apatita primenjeni su i za inkapsulaciju vankomicina<sup>[188],[189]</sup> i arbekacina<sup>[190]</sup>. HAp porozni blokovi koji su sadržali antibiotik ugrađeni su pacijentima kod kojih je prethodno registrovana infekcija kukova uzrokovana implantacijom materijala bez antibiotika. Nakon ugrađivanja implantata sa antibiotikom, kod šest od sedam pacijenata infekcija se nije pojavljivala u toku pet godina u toku kojih su razvoj i ponašanje implantata praćeni.<sup>[191]</sup> Pored antibiotika ugrađenog u okviru poroznih blokova, HAp je primenjen i kao materijal koji je površinski obložen antibiotikom (ciprofloksacin,<sup>[192]</sup> doksiciklin<sup>[139]</sup>). U slučaju doksiciklina adsorbovanog na površini HAp-a, 20% leka je inicijalno otpušteno nakon pet sati nakon čega se brzina otpuštanja smanjila. Ukupan period u toku kog je otpuštena sva količina leka bio je 3-5 dana. Zanimljiva je činjenica da su Ca-deficitarni apatiti omogućavali sporije otpuštanje u poređenju sa stehiometrijskim.<sup>[139]</sup> Najveći problem apatita kao nosača antibiotika je izražen efekat inicijalnog otpuštanja.

Sa stanovišta površinskih osobina, HAp je izrazito hidrofilan i ima negativno površinsko naelektrisanje. Pokazalo se da je proces biomineralizacije na ovim površinama ubrzan i da stimuliše vezivanje ćelija i ubrzava proces srastanja okolnog tkiva sa implantatom. Negativno naelektrisana površina HAp-a ima svojstvo da stimuliše ćelijsku adheziju i ranu fazu ćelijske diferencijacije što je zaključeno na osnovu povećane koncentraciju vezanih proteina alkalne fosfataze koja je detektovana na površini materijala.<sup>[193],[194]</sup>

### 1.5.2.3. KOMPOZITI KAO NOSAČI ANTIBIOTIKA

---

Uprkos izuzetnom naporu koji je uloženo kako bi se dobio materijal koji bi imao svojstva koja mogu obezbediti višestruke funkcije koje su u skladu sa aplikativnim potrebama, veliki je broj primera koji pokazuju da većina materijala primenjenih samostalno nije u stanju da ispuni sve neophodne kriterijume. Pokazalo se da je formiranje kompozita jedan od načina za postizanje multifunkcionalnosti. Ilustracije radi, u Tabeli 1.2 prikazana su svojstva nekih

keramičkih, polimernih i kompozitnih materijala koji se najčešće koriste za zamenu i/ili reparaciju koštanog tkiva i kao takvi predstavljaju potencijalne nosače antibiotika.<sup>[195]</sup>

**Tabela 1.2: Prednosti i nedostaci keramičkih, polimernih i kompozitnih biomaterijala<sup>[195]</sup>**

Materijal	Prednost <sup>2</sup>	Nedostatak
<b>Keramika</b>		
<i>Kalcijum-fosfati (HAp, <math>\beta</math>-TCP)</i>	(i) Biokompatibilnost (++)	(i) Spora resorpcija/degradacija (kristalna struktura)
	(ii) Osteokonduktivnost (+)	(ii) Lomljivi
<i>Bioaktivna stakla i staklasta keramika (biostaklo, fosfatna stakla)</i>	(i) Biokompatibilnost (++)	(i) Spora degradacija (u slučaju delimično kristalne strukture)
	(ii) Osteokonduktivnost (++)	(ii) Lomljivi (amorfna struktura)
	(iii) Kontrola resorpcije (+)	
<b>Polimeri</b>		
<i>Zapreminski biodegradabilni polimeri (PLA, PGA, PLGA, PPF)</i>	(i) Biokompatibilnost (++)	
	(ii) Širok opseg brzina degradacije (++)	(i) Inflamatorni odgovor (kiseli produkti degradacije)
	(iii) Bioresorbilnost (+)	
<i>Površinski biodegradabilni polimeri (poli(orto-estri), poli(anhidridi), poli(fosfazeni))</i>	(i) Biokompatibilnost (++)	(i) Ne mogu biti u potpunosti zamenjeni novim koštanim tkivom
	(ii) Zadržana mehanička celovitost	
<b>Kompoziti</b>	(i) Biokompatibilnost (++)	
	(ii) Osteokonduktivnost (+)	
	(iii) Kontrola vremena degradacije	(i) Komplikovane tehnike pripreme
	(iv) Unapredene mehaničke karakteristike	

Veliki je broj primera koji pokazuju da se kombinacijom dva ili više materijala u cilju formiranja kompozita obezbeđuju uslovi koji su adekvatni za dostavu medikamenata. Primeri kompozitnih materijala izgrađenih kao keramika/keramika, polimer/polimer ili

<sup>2</sup> ++ odlično; + dobro

polimer/keramika koji su upotrebljeni kao nosači antibiotika zajedno sa osobinama koje su formiranjem ovakvih sistema postignuti sumirani su u Tabeli 1.3. [195]

**Tabela 1.3: Kompozitni materijali kao nosači antibiotika i svojstva postignuta formiranjem kompozita.**[195]

Kompozit	Antibiotik	Osobine
<b>Keramika/keramika</b>		
<i>Bifazni kalcijum fosfat (BCP) (HAp/β - TCP)</i>	cefuroksim aksetil <sup>[127]</sup>	Unapređenje degradabilnosti i resorpcije
<i>PerOssal<sup>®</sup> (CaSO<sub>4</sub>(OsteoSet<sup>®</sup>)/HAp (Ostim<sup>®</sup>))</i>	Gentamicin; vankomicin <sup>[174]</sup>	Smanjena toksičnost CaSO <sub>4</sub>
<b>Polimer/polimer</b>		
<i>PLA/poli(sebaksični anhidrid)(PSA)</i>	ofloxacin <sup>[196]</sup>	Kombinacija zapreminske i površinske degradacije (modifikacija vremena degradacije)
<b>Polimer/keramika</b>		
<i>Kolagen/HAp</i>	ciprofloksacin <sup>[136]</sup>	Povećan kapacitet za inkapsulaciju leka
<i>PLGA/TCP</i>	tetraciklin <sup>[197]</sup>	Potpuna degradabilnost
<i>PLGA/HAp</i>	tigeciklin <sup>[24]</sup>	Dobra citokompatibilnost
<i>PLGA/HAp</i>	amoksicilin <sup>[118]</sup>	Povećanje hidrofilitnosti
<i>PLGA/HAp</i>	Klindamicin-baza, klindamicin-fosfat <sup>[23],[143]</sup>	Regulacija mikro pH, postepena degradacija, odsustvo efekta naglog otpuštanja leka

### POLI(D,L-LAKTID-KO-GLIKOLID)/HIDROKSIAPATIT KAO NOSAČ ANTIBIOTIKA

Sposobnost kontrolisane degradacije PLGA polimera zajedno sa bioaktivnošću i osteokonduktivnošću HAp biokeramike čini PLGA/HAp kompozitni materijal izuzetno zanimljivim sa stanovišta kontrolisane dostave antibiotika. U ovom materijalu i polimerni i keramički deo imaju sposobnost da vežu jedan deo antibiotika čime se postiže veći kapacitet za inkapsulaciju leka.<sup>[23]</sup> Multifunkcionalnost ovog materijala ogleda se u postepenoj degradaciji polimera koji učestvuje u otpuštanju jednog dela inkapsuliranog leka, dok se drugi



deo otpušta sa površine keramičke faze koja ujedno ima sposobnost da učestvuje u procesu aktivacije osteogeneze i reparacije nekrozom oštećenog tkiva.<sup>[143]</sup>

Pokazano je da su karbonisani kalcijum-fosfati<sup>[198]</sup>, TCP<sup>[199]</sup> i HAp<sup>[200]</sup> veoma dobri punioci biodegradabilnih poliestara jer imaju sposobnost da regulišu degradacijom inicirano smanjenje pH. Na ovaj način formiranje PLGA/HAp kompozita pruža mogućnost prevazilaženja jednog od nedostataka koji se vezuju za ovaj polimer a koji se odnosi na pojavu iritacije tkiva koja je inicirana padom pH usled polimerne degradacije.<sup>[143]</sup> Kada je reč o površinskim karakteristikama, formiranjem ovog kompozita doprinosi se poboljšanju kvašljivosti i hidrofилnosti površine.<sup>[201]</sup> Poboljšanje kvašljivosti se postiže inicijalno u slučaju u kom HAp oblaže PLGA čestice<sup>[118],[201]</sup> ili u toku degradacije kada HAp kao jezgro izlazi na površinu PLGA omotača.<sup>[202]</sup> Na ovaj način se pruža mogućnost za prevazilaženje i drugog nedostatka PLGA polimera koji se odnosi na nizak nivo hidrofилnosti površine. Povećanjem hidrofилnosti pruža se mogućnost za veoma dobru interakciju ćelija sa materijalom, one imaju sposobnost da adheriraju za njegovu površinu i da započnu prvu fazu diferencijacije.

Prednost formiranja strukture u kojoj je HAp jezgro kompozita dok je PLGA omotač<sup>[143]</sup> je u mogućnosti za potpuno eliminisanje efekta naglog otpuštanja koji se često javlja prilikom otpuštanja leka iz ovog polimera kao i prilikom formiranja strukture u kojoj je HAp omotač<sup>[118]</sup>. Ako se uzme u obzir pozitivno naelektrisanje spoljašnje strane ćelijske membrane, većina ćelija ima afinitet da adherira za površine sa negativnim naelektrisanjem. Iz tog razloga, sa stanovišta površinskih karakteristika, pored poboljšanja kvašljivosti, izgradnjom ovog kompozita postiže se materijal sa negativnim naelektrisanjem površine koji dobro reaguje sa ćelijama. To je u skladu sa činjenicom da je u toku *in vitro* analiza, ovaj materijal pokazao veoma visok stepen citokompatibilnosti.<sup>[24],[202]</sup>

---

## 1.6. STRATEGIJA AKTIVNE I PROAKTIVNE FORME LEKA

---

U toku ispitivanja hemijskih supstanci sa stanovišta potencijalne aktivnosti protiv izazivača određenih bolesti, one koje su bile aktivne označene su kao potencijalni lekovi. Malo se obraćalo pažnje na to da postoji ogromna grupa hemijskih supstanci koje u obliku u kom se nalaze nemaju biološku aktivnost, međutim da one imaju potencijal da se u toku određenih

metaboličkih procesa transformišu u formu koja ima svojstvo leka- odnosno biološku aktivnost. Takve supstance su danas poznate kao proaktivne forme leka.

### 1.6.1. OSNOVNI PRINCIP

---

Osnovni princip strategije koja uključuje primenu proaktivne forme leka zasniva se na mogućnosti za prevazilaženje brojnih barijera koje negativno utiču na dostavu aktivne forme uključujući rastvorljivost, stabilnost pri procesiranju i skladištenju, metaboličku stabilnost, ćelijsku permeabilnost i biološku dostupnost.<sup>[203]</sup>

Sušтина strategije proaktivne forme leka je u dizajniranju lekova sa stanovišta dostave. Iz tog ugla gledano, rastvorljivost supstance je jedan od ključnih faktora čije variranje značajno doprinosi dostavi leka do mesta na kom treba da ispolji svoje dejstvo.<sup>[203]</sup>

Prema Noyes-Whitney modelu, brzina rastvorljivosti leka se matematički može predstaviti jednačinom (1). U ovoj jednačini D je difuzni koeficijent, A je veličina površine koja je u kontaktu sa medijumom u kom se lek rastvara, h je debljina sloja leka čija se rastvorljivost analizira i Cs je ravnotežna rastvorljivost leka u analiziranom medijumu.<sup>[203]</sup>

$$DR = \frac{D \cdot A \cdot C_s}{h} \quad (1)$$

Ova prilično jednostavna i gruba relacija ima određena ograničenja koja se prvenstveno odnose na to da li je uključivanje vrednosti parametara koji u njoj figurišu u odnosu na vodu, kao medijuma za rastvaranje, dovoljno precizna aproksimacija i da li te vrednosti važe u metabolički raznovrsnim delovima organizma pa i same ćelije. Ipak, ona vrlo jednostavno ukazuje na to da brzina rastvorljivosti (koja se može aproksimirati sa brzinom dostave) direktno zavisi od specifične rastvorljivosti hemijske supstance, odnosno leka.<sup>[203]</sup>

Kada je reč o rastvorljivosti lekova i njihovoj dostavi, dosadašnja praksa je pokazala:

- (a) *Da je sa povećanjem doze izazov za dostavu leka sve veći.*
- (b) *Da se slaba aktivnost leka uglavnom povezuje sa njegovom lošom rastvorljivošću, mada je ovo parametar koji može da maskira lošu membransku permeabilnost i nedovoljnu biološku dostupnost.*

Uobičajeni način za poboljšanje rastvorljivosti forme leka koja ima ograničenu rastvorljivost u vodi podrazumeva vezivanje polarne funkcionalne grupe za strukturu njegovog molekula. U slučaju da je molekul koji je funkcionalizovan proaktivna forma leka, to će značiti da bi morala postojati mogućnost da se dodata grupa hemijski ili enzimski ukloni ili modifikuje u cilju dobijanja prvobitne forme koja predstavlja aktivnu ili „roditeljsku“ formu.<sup>[203]</sup>

Princip aktivne i proaktivne forme leka doprineo je unapređenju oralne i parenteralne primene lekova. U nekim slučajevima ovaj pristup nije pokazao željene rezultate jer su i pored znatno povećane rastvorljivosti leka njegova membranska propustljivost i biološka dostupnost i dalje bili nedovoljni. Takav ishod zahteva povećane doze koje sa sobom povlače veću verovatnoću za pojavu neželjenih efekata. Smatra se da je veoma teško predvideti sve barijere kroz koje lek prolazi prilikom ovakvih načina dostave.<sup>[203]</sup> Ipak, strategija aktivne i proaktivne forme leka ostaje izuzetno zanimljiva sa stanovišta lokalne dostave kod koje se broj barijera kroz koje lek prolazi da bi došao do mesta na kome bi trebao da deluje znatno smanjuje (transdermalna dostava aminokiselina).<sup>[204]</sup> U isto vreme, simultana dostava molekula različite rastvorljivosti pruža zanimljivu mogućnost kontrole nad kinetikom njihovog otpuštanja iz nosača što je do sada izuzetno dobro primenjeno za dostavu proteina (albumina i ciklosporina A),<sup>[205]</sup> lekova protiv tuberkuloze (izoniazid i rifampicin)<sup>[138]</sup>, biomarkera (tetrafenil-porfin-tetrasulfidna kiselina i hromazurol B;<sup>[206]</sup> rodamin i fluorescein<sup>[207]</sup>) i antibiotika (doksorubicin i aspirin)<sup>[208]</sup>. Do sada je simultana, kontrolisana dostava aktivne i proaktivne forme leka, kao dve forme jednog molekula različite rastvorljivosti, primenjena kod antibiotika (klindamicin i klindamicin-fosfat)<sup>[23]</sup> i ona predstavlja poseban izazov kada je u pitanju dizajniranje lokalnog načina dostave antibiotika u cilju lečenja ili profilakse infekcijskih bolesti koštanog tkiva.

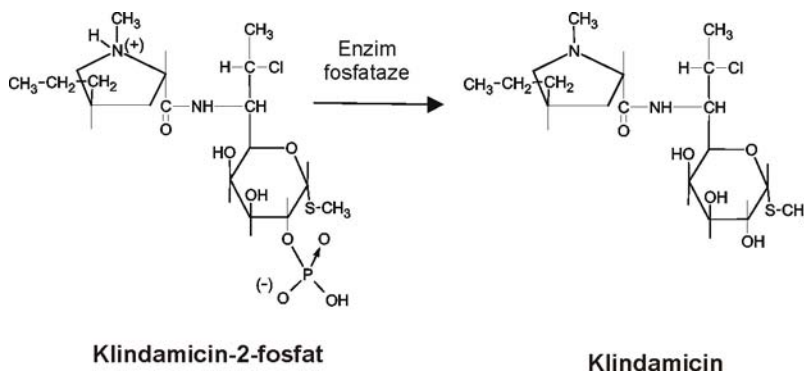
---

### *1.6.2. AKTIVNA I PROAKTIVNA FORMA KLINDAMICINA*

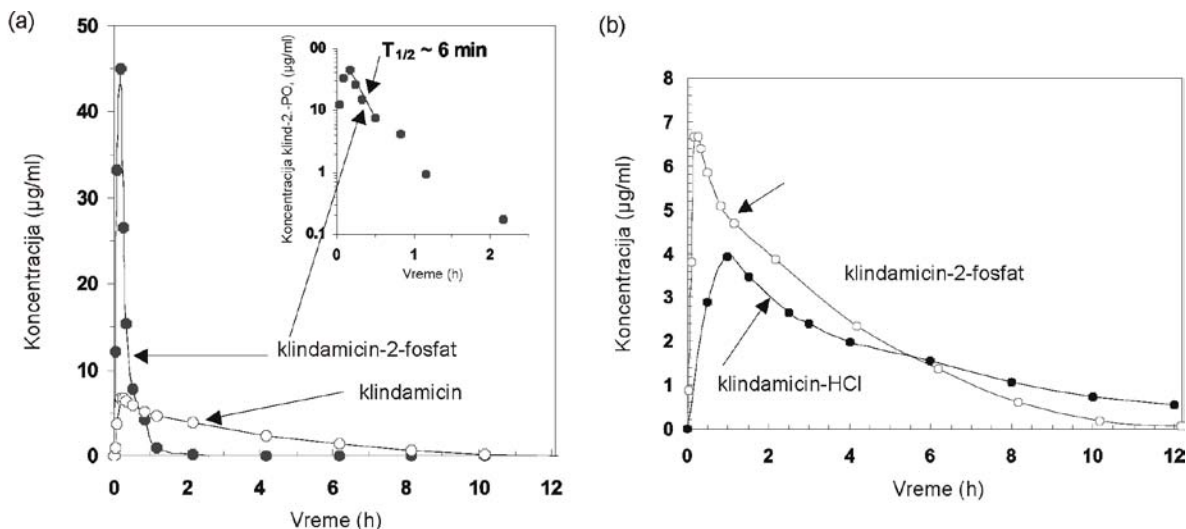
---

Mnogi oblici proaktivne forme leka dizajnirani su funkcionalizacijom pomoću grupa koje se mogu disosovati. Veliki problem predstavlja činjenica da je transport jonskih oblika kroz membranu prilično otežan tako da se mora napraviti ravnoteža između povećane rastvorljivosti i snižene permeabilnosti.<sup>[203]</sup>

Formiranje fosfatnih estara pokazalo se kao izuzetno efikasan način za istovremeno povećanje i jednog i drugog parametra, odnosno i rastvorljivosti i membranske permeabilnosti. Roditeljsku, R-OH, formu leka odlikuju veoma dobra membranska permeabilnost i veoma niska biodistribucija usled niske rastvorljivosti. Princip proaktivne forme je u tome da fosfoestarska forma leka (R-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), ima izrazito poboljšanu rastvorljivost u odnosu na baznu, R-OH, roditeljsku formu. Brzim i efikasnim rastvaranjem fosfoestarske forme omogućena je izuzetno dobra biodistribucija leka. Nakon toga u prisustvu enzima, alkalne fosfataze, fosfoestarska forma biva transformisana u baznu koja zatim ispoljava svoju dobru permeabilnost. [203],[209]



**Slika 1.16.** In vivo konverzija klindamicin-2-fosfata u klindamicin bazu pomoću enzima. [209]



**Slika 1.17.** Koncentracije leka u krvnoj plazmi: (a) dobijene nakon intravenske administracije 150 mg klindamicin-2-fosfata u 50 ml vode, (b) dobijene nakon intravenske administracije klindamicin-2-fosfata i oralne administracije klindamicin-hidrohlrida. [209]

Opisani princip funkcionalizacije formiranjem fosfatnih estara je osnovni princip na kom se baziraju klindamicin baza kao aktivna i klindamicin-2-fosfat kao proaktivna forma leka (slika 1.16). U slučaju ove dve forme klindamicina konverzija iz jednog u drugi oblik dešava se brzo. Na slici 1.17 prikazane su koncentracije klindamicin-2-fosfata i klindamicin baze u krvnoj plazmi koje su dobijene nakon intravenske administracije klindamicin-2-fosfata u koncentraciji od 3 mg/ml (150 mg u 50 ml). Proaktivna forma vrlo brzo postiže maksimalnu koncentraciju u plazmi i odmah započinje konverziju u aktivnu.<sup>[209]</sup>

Efikasnost biodistribucije klindamicin-2-fosfata ilustrovana je na slici 1.17b. Slika predstavlja poređenje koncentracije klindamicin-2-fosfata (koja se dobija u krvnoj plazmi nakon intravenske administracije proaktivne forme leka) i koncentracije klindamicin-hidrohlorida (koja se dobija u krvnoj plazmi nakon oralne administracije proaktivne forme leka). U prvom slučaju maksimalna koncentracija proaktivne forme u plazmi postiže se mnogo brže i ima skoro dvostruko veću vrednost.<sup>[209]</sup>

Sistematska administracija klindamicina zahteva prilično visoke koncentracije usled kojih se on distribuira i akumulira u različitim delovima organizma.<sup>[129]</sup> Najveći problem ovakve administracije je pojava neželjenih efekata. Najteži neželjeni efekt klindamicina je pseudomembranozni kolitis koji predstavlja poremećaj u digestivnom traktu koji može biti potencijalno letalan. Njegova pojava je posledica razvoja bakterije *Clostridium difficile* rezistentne na klindamicin koja nastaje usled dugotrajne oralne upotrebe visokih koncentracija ovog antibiotika.<sup>[210]</sup>

Glavni cilj lokalne, kontrolisane dostave klindamicina je u prevazilaženju teškoća koje su vezane za ovaj antibiotik koji je inače izuzetno efikasan protiv glavnih izazivača infekcijskih bolesti koštanog tkiva. To se može postići najpre lokalizovanošću, koja isključuje i biodistribuciju leka u celom organizmu kao i potrebu za primenom visokih koncentracija.

Lokalna primena klindamicina započeta je sa peridentalnim EVA vlaknima koji su formulisani za tretman infekcija u stomatologiji, <sup>[148],[147]</sup> razvijena je preko multi-slojevitih struktura PLA i PLGA biodegradabilnih implantata,<sup>[124]</sup> do formulacija koje obuhvataju kontrolisanu dostavu proaktivnih formi leka kao što je inkapsulacija klindamicin-fosfata u okviru lipozoma za površinsku (kožnu) administraciju,<sup>[130]</sup> formiranje slojeva klindamicin-palmitata na sintetskim srčanim zaliscima<sup>[211]</sup> i inkapsulacija klindamicin-hidrohlorida u

okviru filmova poliuretana i PEG-a.<sup>[131]</sup> U cilju produžene kontrolisane dostave na mestu infekcije ovaj antibiotik je inkapsuliran u okviru „jezgro-omotač“ struktura PLGA/HAP kompozitnih čestica u formi klindamicin-2-fosfata i klindamicin-baze. Ovakva formulacija namenjena je za formiranje materijala koji bi se mogao koristiti za preventivu i za tretman infekcijskih bolesti koštanog tkiva.<sup>[23]</sup>

## 1.7. BIOKOMPATIBILNOST

---

Prilikom razvoja sistema za dostavu leka, pored kreiranja optimalnog dizajna materijala i efikasnosti dostave medikamenta, izuzetno je važno predvideti na koji način materijal interaguje sa ćelijama i tkivom koji će se prilikom praktične primene naći u njegovom okruženju. Biokompatibilnost se generalno može definisati kao svojstvo materijala da iskaže benignu interakciju sa biološkim okruženjem i da na adekvatan način obezbedi funkcionalnost zbog koje je implantiran bez negativnih uticaja na biološke procese i funkcije organizma.<sup>[212],[213]</sup> Kako se jedino biološki, prirodno napravljeni materijali mogu smatrati apsolutno biokompatibilnim, većina do sada poznatih sintetskih materijala koji se primenjuju za formiranje medicinskih implantata ima svojstvo da u određenoj meri izazove reakciju imunog sistema. Međutim mera u kojoj je ova reakcija pokrenuta neće u svakom slučaju rezultirati odbacivanjem implantata. Iz tog razloga optimizacija nivoa biokompatibilnosti materijala je izuzetno važan korak u procesu njegovog formiranja.<sup>[214]</sup>

Kada je reč o materijalima za lokalnu, kontrolisanu dostavu lekova, biokompatibilnost je specifičan problem i predstavlja naročito važan aspekt analize jer su ovi materijali formirani kao nosači velikih koncentracija lekova, koje višestruko prevazilaze toksične doze, koje treba postepeno da se otpuste u toku dužeg vremenskog perioda. To podrazumeva postojanje mogućnosti da se i pored izbora materijala koji su do sada pokazali dobar nivo biokompatibilnosti može postići izuzetno negativan odgovor organizma usled neadekvatnog ispunjavanja funkcije zbog koje je materijal implantiran- kao što je naglo i nekontrolisano otpuštanje leka.

Ispitivanje biokompatibilnosti materijala je sistematičan i dugotrajan proces koji mora biti odgovarajuće strukturiran. U skladu sa Agencijom za hranu i lekove (*eng. „Food and Drug*

Agency“ (FDA)), standardna procedura za ispitivanje biomedicinskih implantata podrazumeva nekoliko koraka koji se mogu podeliti na:

- (i) *Inicijalne testove* (citotoksičnost, mutagenost)- nespecifični testovi na ćelijskim kulturama i malim životinjama
- (ii) *Sekundarne testove* (senzitivnost, implantacioni testovi, iritacijski testovi)- specifični testovi na subhumanim primatima (većim životinjama)
- (iii) *Probne testove*- prekliničko i kliničko humano testiranje<sup>[215]</sup>

### 1.7.1. DOPRINOS POVRŠINSKIH KARAKTERISTIKA BIOKOMPATIBILNOSTI MATERIJALA

*In vitro* biokompatibilnost, kao početni korak u testiranju materijala, ima veliku važnost iz tog razloga što su testovi koji su razvijeni za ovu vrstu analize predviđeni da simuliraju i predvide biološke reakcije ćelija i tkiva na prisustvo materijala u organizmu. Ovi testovi su koncipirani tako da pružaju mogućnost određivanja toksičnosti (kao udela preživelih ćelija koji se najčešće meri propustljivošću membrane ili metaboličkim parametrima kao što su ćelijska deoba i/ili enzimska aktivnost) i određivanja sposobnosti za uspostavljanje kontakta između ćelija i materijala (određivanjem adhezivnosti, proliferacije i diferencijacije ćelija na površini materijala).<sup>[216]</sup>

Interakcije između materijala i ćelija dešavaju se na kontaktnoj površini. Ovaj proces je izuzetno dinamičan i zavisi od brojnih faktora. Osnovna karakteristika ovog procesa je da se dešava u više koraka počev od inicijalnog kontakta do dugoročnog ćelijskog odgovora:

1. **Prvi korak.** Uspostavljanje kontakta između površine materijala i tečnosti.
2. **Drugi korak.** Odnosi se na adsorbovanje proteina za površinu materijala koji je u kontaktu sa telesnom tečnošću. Ovaj korak je nezavisan od ćelija i na njega utiču fizičko-hemijske karakteristike materijala.
3. **Treći korak.** Ovaj korak zavisi od ćelija i podrazumeva njihovu adheziju za površinu materijala.
4. **Četvrti korak.** Uspostavljanje dugoročnog ćelijskog odgovora od koje zavisi sudbina implantata.

Za razliku od ćelijske adhezije koja se dešava brzo, adsorbovanje proteina je spor proces jer uključuje brojne molekulske vrste (proteine ekstracelularne matrice, proteine ćelijske membrane i proteine citoskeleta) koje doprinose odgovarajućem ćelijskom odgovoru kao što su migracija i diferencijacija. Ćelijska adhezija predstavlja mehaničku vezu između unutrašnjih aktinskih filamenata ćelije i površine materijala. Nastali kompleks je poznat kao fokalna adhezija. Fokalni kontakti na površini imaju specifične receptorske proteine (kao što su integrini) koji predstavljaju međupovršinu između citoskeleta (unutar ćelije) i proteina (na površini materijala). Dugoročni odgovor ćelija će, i nakon ispunjenog površinskog vezivanja proteina i adhezije ćelija za površinu materijala, zavisiti od biofizičkih (mehaničkih i provodnih) karakteristika kontaktne površine ćelija/materijal. Od njih će zavisiti mogućnost za migraciju, proliferaciju i diferencijaciju ćelija na površini materijala.<sup>[217],[218]</sup>

Do sada je pokazan veoma visok stepen zavisnosti između površinskih karakteristika materijala i adhezije ćelija kojoj prethodi adhezija proteina. Površinske karakteristike materijala koje u ovoj zavisnosti igraju važnu ulogu su: topografija površine, specifična površina, površinsko naelektrisanje, površinske funkcionalne grupe i kvašljivost.<sup>[219]</sup>

**Topografija (uključujući oblik, veličinu i hrapavost) i specifična površina.** Ove karakteristike materijala pripadaju grupi veoma važnih parametara koji značajno utiču na adhezivnu sposobnost ćelija. <sup>[217]</sup> Odnos površine i zapremine nanostrukturnih i nanočestičnih materijala pruža veoma dobru mogućnost za unapređenje materijala koji se danas koriste u tkivnom inženjerstvu upravo zbog svojstva da ispoljavaju poboljšanu citokompatibilnost promovišući ćelijsku adheziju.<sup>[43]</sup> Sličan efekat je zapažen i u slučaju poroznih materijala koji takođe imaju mogućnost da obezbede veliku slobodnu površinu koja je dostupna za vezivanje ćelija.<sup>[221]</sup> Uređene strukture koje odlikuje pravilna topografija su favorizovane od strane ćelija jer im olakšavaju proces vezivanja za površinu. Ćelije su osetljive i na mikro- i na nano- veličinu topografskih motiva na površini materijala.<sup>[222],[223]</sup> Na to najbolje ukazuju primeri prostorno uređenog vezivanja ćelija za površinu materijala koje prati teksturu njegove površine. Zanimljivo je to da su u ovom slučaju ćelije pored prostorno organizovanog vezivanja, pokazivale i prostorno organizovanu orijentaciju i oblik u zavisnosti od motiva na površini materijala.<sup>[224]</sup> Kada je reč o favorizovanju uređenih struktura od strane ćelija, ilustrativan primer je i specifično vezivanje ćelija za površinu samouređenih monoslojeva (SMS).<sup>[225]</sup> Ovo svojstvo ćelija prvenstveno zavisi od površinskih grupa SMS struktura, ali ukazuje i na



povezanost između velikog broja samouređenih struktura u prirodi i činjenice da su i same ćelije predstavnici visoko-uređenih organizacija formiranih iz samouređenih struktura. Ćelije pokazuju zanimljiv odgovor i na gustinu pakovanja strukture materijala tako da se ove strukture mogu veoma efektivno primeniti u praksi. [53], [219] Primera radi, pokazano je da prisustvo gusto pakovanih (111) kristalografskih ravni kuboktaedarskih čestica srebra značajno povećava antibakterijsko svojstvo ovog metala.[226]

**Fizičko-hemijske osobine površine materijala.** Naelektrisanje, vrsta grupa i kvašljivost površine utiču na ponašanje ćelija koje su senzitivne na njihove promene.

Već je pomenuto da ćelije imaju svojstvo da slede teksturu SMS slojeva koja je izgrađena iz hemijski specifičnih tekstura (krugova ili linija). Pokazalo se da postoji određena zavisnost između vrste hemijskih grupa na površini materijala i ćelijske adhezije i diferencijacije. [225] Glavni razlog ovakve pojave je specifično vezivanje integrina. Primera radi, prisustvo polarnih površinskih grupa omogućava dobru fokalnu adheziju za razliku od nepolarnih kod kojih je nivo vezivanja dosta nizak. [219]

Prisustvo polarnih, hidrofilnih, površinskih grupa, poput karboksilnih, hidroksilnih i amino grupa, poboljšava kvašljivost površine materijala. [219] Kvašljivost je posledica interagujućih (adhezivnih) sila između površine materijala i tečnosti. Pokazalo se da je u slučaju niske kvašljivosti površine postignut nizak nivo adhezije ćelija. [217] To je jedan od glavnih razloga zbog kog se modifikacija površine primenjuje kod mnogih polimernih i keramičkih materijala (najčešće površinskim ugrađivanjem specifičnih grupa ili oblaganjem površine drugim materijalom) u cilju postizanja bolje bioaktivnosti.[227],[229]

Zeta potencijal koji se koristi za merenje površinskog naelektrisanja materijala predstavlja razliku potencijala površinskog i difuznog sloja adsorbovanih jona na površini materijala. [217] Precizno definisan način na koji ćelije reaguju na različito naelektrisanje površine nije formulisan, ali je primećeno da čestice sa niskom vrednošću negativnog naelektrisanja površine imaju svojstvo da se u toku *in vivo* biodistribucije specifično akumuliraju u ćelijama tumora.[228] Uzimajući u vidu pozitivnu naelektrisanost ekstracelularne i negativnu naelektrisanost intracelularne strane ćelijske membrane, kao i to da ona ima pozitivnu razliku potencijala,[230] naelektrisanje površine materijala bi trebalo dizajnirati sa posebnom pažnjom i prilagoditi ga specifičnim potrebama za koje je materijal sintetisan.[193]

# CILJ RADA

---

## II

Koncept kontrolisane dostave medikamenata danas podrazumeva novi, napredniji način primene lekova čiji je cilj unapređenje efikasnosti i kvaliteta lečenja. Prednosti ovakvog načina lečenja u odnosu na tradicionalni podrazumevaju kontrolu nad koncentracijom otpuštenog leka koji deluje lokalno, čime se postiže njegova optimalna koncentracija na ciljanom mestu uz sprečavanje nagomilavanja u delovima organizma u kojima se on ne upotrebljava čime se potencijalno sprečava ili ublažava nastanak neželjenih efekata. Očekuje se da bi primena ovog koncepta u lečenju hroničnih bolesti koštanog tkiva bila u mogućnosti da prevaziđe većinu nedostataka koji su povezani sa tradicionalnim lečenjem.

PLGA/HAp je kompozitni materijal izgrađen iz polimernog dela koji odlikuje biodegradabilnost i keramičkog dela koji odlikuje bioaktivnost. Kao takav, ovaj materijal ima potencijal da, u formi lokalno primenjenog implantata, obezbedi kontrolisano otpuštanje inkapsuliranog leka i njegovo doziranje na mestu infekcije kao i regeneraciju infekcijom izazvanog oštećenja koštanog tkiva.

Cilj ovog rada je:

***(i) Inkapsulacija aktivne i proaktivne forme leka u okviru PLGA/HAp kompozita, izgrađenog iz polimernog omotača i biokeramičkog jezgra, u cilju postizanja materijala sa karakteristikama optimalnim za potencijalnu primenu u kontrolisanoj dostavi antibiotika.***

U okviru čega je potrebno:

- Optimizovati metodu za inkapsulaciju klindamicina u formi proaktivnog fosfata i aktivne baze u okviru čestica PLGA/HAp-a u cilju dobijanja uniformne raspodele veličina i oblika sfernih čestica nosača leka.
- Ispitati strukturne karakteristike čestica PLGA/HAp/klindamicina i raspodele leka u okviru njih.
- Ispitati uticaj leka na morfološke i površinske karakteristike PLGA/HAp čestica nosača.

***(ii) Praćenje procesa degradacije polimernog dela PLGA/HAp kompozitnog nosača i ispitivanje kinetike simultanog otpuštanja aktivne i proaktivne forme leka.***

U okviru čega je potrebno:

- Simulirati degradaciju polimernog dela PLGA/HAp kompozita u fiziološkim uslovima tokom koje bi se ispitale promene morfoloških, strukturnih, makromolekulskih i površinskih karakteristika ovog materijala sa vremenom degradacije.
- Pratiti kinetiku otpuštanja obe forme leka koja se dešava uporedo sa degradacijom polimernog dela kompozita i odrediti uzajamni uticaj procesa degradacije i procesa otpuštanja.

***(iii) Ispitivanje kompatibilnosti materijala sa ćelijama u in vitro uslovima.***

U okviru čega je bilo potrebno:

- Ispitati nivo kompatibilnosti PLGA/HAp materijala sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina sa fibroblastnim ćelijama primenom više uporednih testova citotoksičnosti.
- Ispitati mogućnost interakcija ćelija sa PLGA/HAp/klindamicinom kao i njihove adhezije i rasta na njegovoj površini.

# **EKSPERIMENTALNI DEO**

---

## **III**

### **3.1. MATERIJALI**

---

#### **3.1.1. MATERIJALI ZA SINTEZU I PROCESIRANJE**

---

U toku procesiranja PLGA/HAp kompozita i inkapsulacije antibiotika korišćene su komercijalne granule PLGA polimera sa molarnim udelom laktidne i glikolidne kopolimerne komponente 50:50, molarne mase 40000-75000 ("Sigma Aldrich", Nemačka). Kao rastvarači/nerastvarači polimera primenjeni su aceton, acetonitril, etanol i izopropanol (Sigma Aldrich, Nemačka). Hidroksiapatit, kao neorganski deo kompozita, sintetisan je pomoću kalcijum-nitrat tetra-hidrata ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) ("Sigma Aldrich " Nemačka), amonijum-dihidrogenfosfata ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) ("Sigma Aldrich", Nemačka) i uree ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) ("Aestar", Nemačka). Model antibiotika koji je inkapsuliran u PLGA/HAp kompozit bio je klindamicin u formi fosfata ( $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{O}_9\text{SP}$ ) i baze ( $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$ ) ("Chephassar GmbH", Nemačka). Stabilizacija čestica je obezbeđena pomoću poli(vinil-pirolidona) (PVP) ("Merck", Nemačka) srednje molarne mase 29000 Da i stepena hidrolize u vrednosti od 98 %.

Za fluorescentno obeležavanje primenjeni su fluoresceinamin ("Sigma Aldrich", Nemačka), izomer alizarin- crveno ("Sigma Aldrich", Nemačka) i tetra metil-rodamin-izotiocijanat ("Sigma Aldrich", Nemačka).

#### **3.1.2. MATERIJALI ZA DEGRADACIJU POLIMERA I OTPUŠTANJE LEKA**

---

Simuliranje fizioloških uslova za praćenje degradacije polimernog dela PLGA/HAp kompozita i otpuštanje leka vršeno je pomoću fosfatnog pufera (PBS) (1 tableta rastvorena u 200 ml destilovane vode sadrži sledeće koncentracije soli: 0.137 M natrijum-hlorida (NaCl), 0.01 M fosfatnog pufera i 0.0027 M kalijum-hlorida (KCl), ("Sigma Aldrich", Nemačka). Kao konzervans primenjen je natrijum-azid ( $\text{NaN}_3$ ) ("Sigma Aldrich Fluka" (Biochemica), Nemačka).

#### **3.1.3. MATERIJALI ZA *IN VITRO* TESTOVE CITOTOKSIČNOSTI**

---

Za detekciju preživljavanja ćelija u okviru testova citotoksičnosti primenjeni su: MTT rastvor (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) (Sigma Aldrich, Nemačka), hlorovodonična kiselina (HCl) (Sigma Aldrich, Nemačka), hranljivi agar (Sigma Aldrich,

Nemačka) i indikatorke boje za bojenje ćelija- tripan plavo (*eng. "trypan blue"*) i neutralno crveno (*eng. "neutral red"*) (Sigma Aldrich, Nemačka).

---

### 3.1.4. ĆELIJSKE KULTURE

---

Testovi citotoksičnosti vršeni su na fibroblastima iz miša (L929) (ECCAC No 85011425) i humanim fibroblastima iz pluća (MRC-5) (ECCAC No 84101801). Ćelije su održavane u hranljivom medijumu (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (Gibco BRL, UK) koji je sadržao glukozu (4.5 g/L), fetusni goveđi serum (*eng. "fetal calf serum"*, FCS) (NIVNS) i antibiotike- 100 IJ/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina. Linije su održavane u inkubatoru (Heraeus) pod standardnim uslovima na temperaturi od 37°C i atmosferi vazduha (95%) i ugljen-dioksida (CO<sub>2</sub>) (5%).

---

## 3.2. METODE

---

### 3.2.1. METODA PROCESIRANJA KOMPOZITA I INKAPSULACIJE LEKA

---

Za formiranje PLGA/HAp kompozita i inkapsulaciju leka primenjena je metoda ultrazvučnog procesiranja koja se sastojala iz četiri koraka:

Primenom metode homogene sonohemijske precipitacije u prvom koraku sintetisan je HAp. U toku tog postupka vodeni rastvori Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (2·10<sup>-2</sup> M, 50 ml) i NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1·10<sup>-2</sup> M, 50 ml) su najpre zagrevani do temperature od 88 °C nakon čega je uspostavljeno ultrazvučno polje i dodat je vodeni rastvor uree (2·10<sup>-2</sup>M, 10 ml). Sonifikacija je vršena u toku 3h na maksimalnoj temperaturi od 90 °C uz primenu sledećih ultrazvučnih parametara: snage ultrazvučnog polja P = 600 W, frekvencije ultrazvučnog polja  $f = 20$  kHz i trajanja radnog i relaksacijskog režima u toku 02:01 s. Pri ovim uslovima obezbeđena je ravnomerna razgradnja uree koja je omogućila homogenu precipitaciju hidroksiapatita. Nakon precipitacije, talog je imao period starenja od 12h posle koga je centrifugiranjem (4000 rpm) odvojen od supernatanta.<sup>[15]</sup>

U drugom koraku sonohemijski sintetisani HAp (c=1·10<sup>-2</sup> mg/ml) je procesiran poljem ultrazvuka visokog intenziteta u cilju finog dispergovanja i deaglomeracije. Visok intenzitet ultrazvuka je postignut primenom male zapremine tečnog medijuma (10 ml etanola).

Deaglomeracija je trajala u toku 10 minuta na sobnoj temperaturi pri istim parametrima ultrazvuka pri kojima je HAp sintetisan.<sup>[16]</sup>

U trećem koraku rastvaranjem polimera u izabranom rastvaraču (aceton, acetonitril ili smeša acetona/acetonitrila) napravljen je 2 % rastvor PLGA. Vodeni rastvor klindamicina postepeno je ukapavan u rastvor PLGA u odgovarajućem rastvaraču uz konstantno mešanje (1200 rpm). U slučaju kada je kao rastvarač polimera bio acetonitril primenjene su tri koncentracije klindamicina (38.4, 19.2 i 9.6 mg/ml) koje su omogućile formiranje PLGA/HAp kompozita sa 1, 5 i 10 % inkapsuliranog antibiotika. Prilikom rastvaranja polimera u ostalim rastvaračima primenjen je vodeni rastvor klindamicina najveće koncentracije (38.4 mg/ml).

U toku poslednjeg koraka, ultrazvučno deaglomerisani HAp (koji je centrifugiranjem odvojen od etanola) je sonifikacijom fino redispergovan u smeši rastvora polimera i klindamicina u toku 2 min. Količina dodatog HAp-a odgovarala je formiranju PLGA/HAp kompozita sa 90 % polimera i 10 % apatita. Nakon dodatka izabranog polimernog nerastvarača (izopropanol, etanol, voda ili smeša etanol/voda) formirana je mlečno bela disperzija usled početka precipitacije polimera i formiranja kompozita što je omogućilo inkapsulaciju klindamicina. Formirana disperzija je ukapavanjem dodata vodenom rastvoru PVP-a (20 mg/ml, 200 ml) u cilju stabilizacije čestica. Ukapavanje je praćeno sonifikacijom uz primenu sledećih parametara: snage polja  $P = 142.5 \text{ W}$ , frekvencije polja  $\nu = 20 \text{ kHz}$  i trajanja radnog i relaksacionog režima u toku 02:01 s.<sup>[23]</sup>

U toku trećeg i četvrtog koraka svi primenjeni rastvori su ohlađeni do temperature od 8°C koja je u toku procesiranja održavana pomoću leda.

Pored formiranja kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom opisana procedura primenjena je za procesiranje sledećih materijala: HAp/klindamicin, PLGA/klindamicin, HAp i PLGA.

U toku svih eksperimenata primenjena je Sonics Vibra Cell ultrazvučna sonda visokog intenziteta (Ultrasonic Processors for High Volume Applications VCX 750, Newtown, Connecticut, USA) koja je prikazana na slici 3.1.





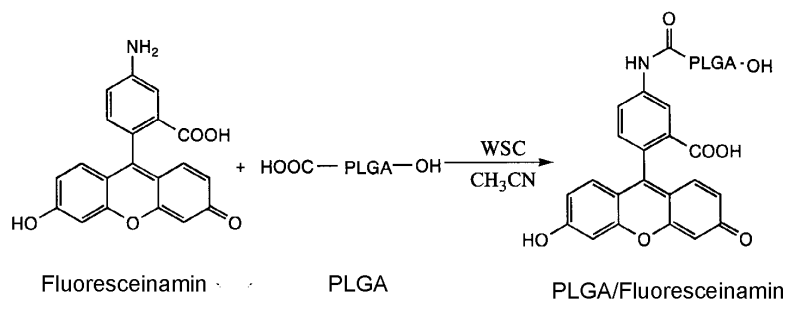
**Slika 3.1.** Ultrazvučna sonda visokog intenziteta koja je korišćena u toku procesiranja kompozita i inkapsulacije klindamicina.

### 3.2.1.1. OBELEŽAVANJE FLUORESCENTNIM BOJAMA

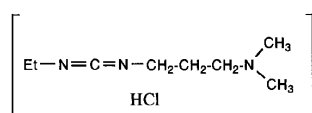
U cilju funkcionalizacije materijala radi lakše detekcije preraspodele faza koje grade strukturu PLGA/HAp kompozitnih čestica sa inkapsuliranim klindamicinom, svaka od komponenti obeležena je fluorescentnom bojom.

#### **Obeležavanje PLGA polimera**

PLGA je obeležen pomoću fluoresceinamin I izomera, fluorescentnom bojom koju karakteriše zelena emisija ( $\lambda_{\text{ekscitacije}} = 494 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisije}} = 518 \text{ nm}$ ).<sup>[231]</sup> Procedura je podrazumevala formiranje koncentrovanog rastvora polimera u acetonitrilu (1 g polimera rastvoren je u 10 ml acetonitrila). Rastvoru je dodato 15 mg karboimida (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karboimid hidrohlorid) i 20 mg fluoresceinamina. Reakcija je trajala 24h. U toku ovog vremena karboimid se vezuje za terminalne, karboksilne grupe PLGA lanaca gradeći sa njima estarsku vezu. On ima ulogu vezujućeg agensa (eng. „*coupling agent*“) koji sa jedne strane reaguje sa polimerom dok sa druge strane reaguje sa fluoresceinaminom (slika 3.2). Ovako obeleženi polimer je stabilan jer metoda omogućava kovalentno vezivanje fluoresceinamina za karboksilne grupe preko karboimida. Nakon obeležavanja, ispiranje neizreagovanih komponenti vršeno je pomoću dihlormetana.



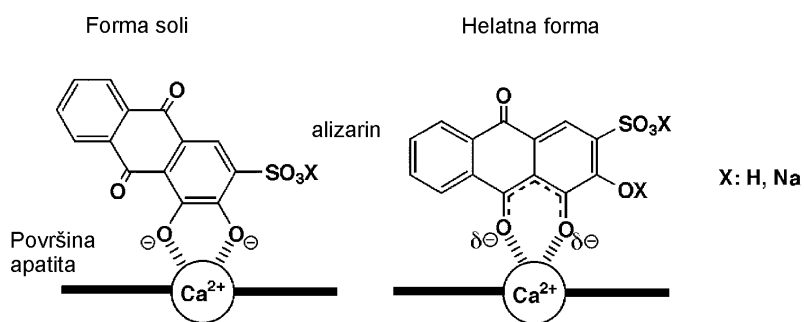
WSC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karboimid hidrohlorid



**Slika 3.2.** Procedura za obeležavanje PLGA pomoću fluoresceinamina. [231]

### Obeležavanje HAp-a

HAp je obeležen pomoću alizarina koji ima crvenu emisiju ( $\lambda_{\text{ekscitacije}}=530-560$  nm;  $\lambda_{\text{emisije}}=580$  nm). Alizarin (4 mg) je rastvoren u vodenom rastvoru natrijum-hidroksida (4 mg/ml). Sonoheмиjski sintetisani HAp (m=98 mg) je dispergovan u 40 ml rastvora alizarina. Reakcija obeležavanja je trajala sat vremena nakon čega je obeleženi HAp odvojen centrifugiranjem i ispran etanolom. U toku ovog vremena alizarin se vezuje za HAp po principu hemisorpcije sa kalcijumovim jonima na njegovoj površini (slika 3.3). [232]

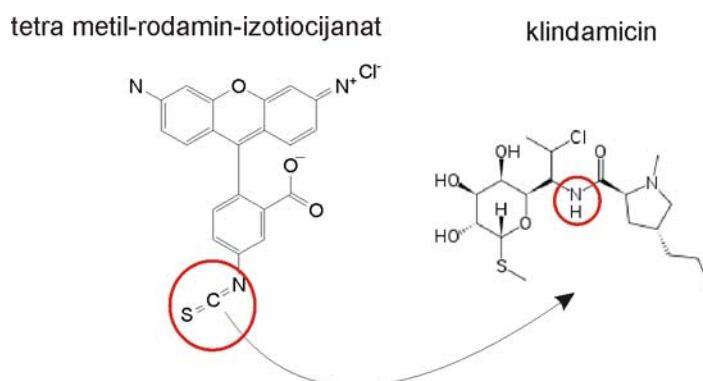


**Slika 3.3.** Mehanizam vezivanja alizarina za površinu HAp-a. [232]

### Obeležavanje klindamicina

U toku razvoja metode za obeležavanje klindamicina, izbor fluorescentne boje bio je tetra metil-rodamin-izotiocijanat (rodamin B) koji ima crvenu emisiju ( $\lambda_{\text{ekscitacije}}=557$  nm;

$\lambda_{\text{emisije}}=578 \text{ nm}$ ). On ima sposobnost da se veže za primarne i sekundarne amine i najčešće se primenjuje za obeležavanje proteina.<sup>[233]</sup> U PLGA/HAp/klindamicinu sekundarni amin poseduje samo antibiotik (slika 3.4). Procedura obeležavanja je bila sledeća: rodamin (5mg) je rastvoren u 10 ml vode, rastvoru je dodat klindamicin (165 mg) i reakcija obeležavanja je trajala 3 h. Po završetku reakcije crveni precipitat je nekoliko puta ispran vodom.



**Slika 3.4.** *Mehanizam vezivanja tetra metil-rodamin-izocijanata za klindamicin.*

Obeleženi materijali, PLGA-fluoresceinamin, HAp-alizarin i klindamicin-rodamin, primenjeni su kao polazni prekursori za formiranje PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom po istoj proceduri koja je korišćena za procesiranje neobeleženog kompozita sa antibiotikom (3.2.1. Metoda procesiranja kompozita sa antibiotikom). Ista procedura je primenjena i za procesiranje svake od komponenti kompozita (PLGA, HAp i klindamicina) pojedinačno.

### 3.2.2. METODA DEGRADACIJE POLIMERNOG DELA KOMPOZITA I OTPUŠTANJA LEKA

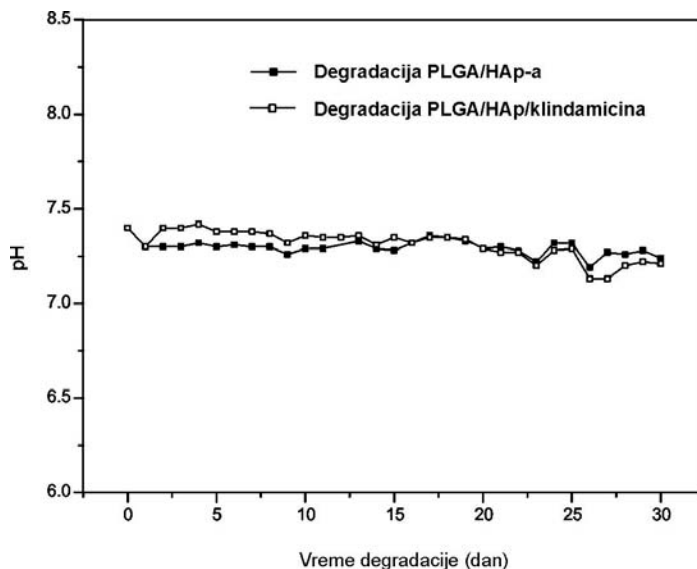
U cilju ispitivanja degradacije polimernog dela PLGA/HAp kompozita i otpuštanja leka primenjena je metoda za simuliranje fizioloških uslova. Metoda se zasnivala na obezbeđivanju kiselosti i hemijskog sastava sredine na nivou istom kao u krvnoj plazmi sisara ( $\text{pH}=7.4$ ), održavanju temperature podobne temperaturi živog organizma ( $37^\circ\text{C}$ ), obezbeđivanju dinamičkih uslova koji simuliraju cirkulaciju (60 otkucaja u sekundi je vrednost prosečnog pulsa kod čoveka) kao i simulaciji imunog sistema u cilju prevencije razvoja patogena (naročito bakterija koje imaju afinitet ka vodenoj sredini). Za tu namenu primenjeno je vodeno kupatilo sa konstantnim mešanjem (Memert, WNB 7-45, Nemačka) (slika 3.5) pomoću koga su obezbeđeni temperatura od  $37.0\pm 0.1^\circ\text{C}$  i horizontalno mešanje brzinom od 60 rpm.

Kiselost sredine i jonska jačina su regulisani pomoću vodenog rastvora fosfatnog pufera (PBS) koji je primenjen kao degradacijski medijum koji sadrži koncentraciju soli jednaku njihovoj koncentraciji u krvnoj plazmi i koji je u mogućnosti da održava vrednost pH oko 7.4. Kao konzervans primenjen je vodeni rastvor  $\text{NaN}_3$  (0.2 g/L).



*Slika 3.5. Vodeno kupatilo sa mešanjem koje je korišćeno za praćenje procesa degradacije polimernog dela PLGA/HAp kompozita i otpuštanje klindamicina.*

Eksperiment je koncipiran na taj način da su za svaki udeo inkapsuliranog klindamicina (PLGA/HAp/klindamicin (10, 5, 1 i 0 %)) istovremeno analizirane po četiri jednake serije u cilju provere ponovljivosti i statističke obrade podataka. Svaka serija je sadržala uzorke koji su odgovarali određenom vremenskom periodu degradacije koji je u okviru ukupnog analiziranog perioda od 30 dana izabran za analizu. Kivete su sadržale po 50 mg uzorka (PLGA/HAp ili PLGA/HAp/klindamicin) i 10 ml PBS pufera. Degradacijski medijum je osvežavan dnevno zamenom 5 ml starog sa 5 ml svežeg pufera. Neposredno pre svake dnevne zamene degradacijskog medijuma u svim serijama je merena vrednost pH (Metrohm 780 pH-metar, Švajcarska). Grafik dnevne oscilacije pH sa vremenom degradacije u toku 30 dana predstavljen je na slici 3.6. Sve vrednosti su dobijene usrednjavanjem kiselosti za sve četiri serije. Nakon određenog vremenskog perioda kivete su centrifugirane (4000 rpm) u cilju odvajanja supernatanta od taloga preostalog nakon degradacije. Supernatanti su čuvani na 4°C za analizu koncentracije otpuštenog leka, dok je talog ispran destilovanom vodom, osušen na staklenim mikroskopskim pločicama bez prisustva svetlosti i skladišten do dalje karakterizacije.



**Slika 3.6.** Promena pH vrednosti degradacijskog medijuma u toku degradacije PLGA/HAp kompozita (●) i PLGA/HAp/klindamicina (○).<sup>[143]</sup>

Pored otpuštanja klindamicina iz PLGA/HAp kompozitnog materijala, praćeno je i njegovo otpuštanje iz HAp/klindamicina. Praćenje otpuštanja leka sa površine HAp-a je vršeno pri jednakim uslovima kao u slučaju praćenja otpuštanja leka iz kompozita. Serija uzoraka koji su sadržali 50 mg HAp/klindamicina u 10 ml degradacijskog pufera (vodenog rastvora PBS pufera i  $\text{NaN}_3$  konzervansa) odgovarala je određenim vremenskim intervalima u toku osmodnevne analize otpuštanja leka. U svim kivetama degradacijski medijum je osvežavan dnevno.<sup>[143]</sup>

### 3.2.3. METODA STERILIZACIJE

#### **Sterilizacija $\gamma$ -zračenjem**

Priprema uzoraka za *in vitro* analizu citotoksičnosti podrazumevala je kompaktiranje materijala u cilju formiranja tableta dijametra 10 mm koje su u daljem postupku bile sterilizovane. Za sterilizaciju je primenjena metoda  $\gamma$ -zračenja. Uzorci su zračeni u  $^{60}\text{Co}$  radijacionoj jedinici pri atmosferskim uslovima (u atmosferi vazduha i na sobnoj temperaturi). Prilikom sterilizacije primenjeni su sledeći parametri: brzina ozračivanja od 9kGy/h i ukupna apsorbovana doza zračenja od 25 kGy (ovi parametri su u skladu sa standardom za radijacionu sterilizaciju medicinskih uređaja- "European standard E552"). Na

ovaj način za svaki od četiri analizirana sadržaja inkapsuliranog klindamicina (PLGA/HAP kompozita sa 0, 1, 5 i 10 % klindamicina) pripremljene su po četiri tablete. Tablete PLGA/HAP-a bez leka služile su kao referentni material.

### 3.2.4. METODE ZA ANALIZU SVOJSTAVA MATERIJALA

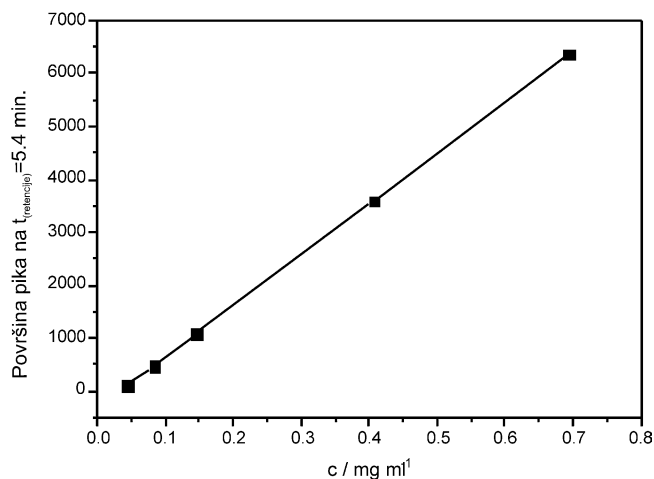
#### ***Preletna masena spektrometrija/tečna hromatografija visokih performansi (TOF-MS/UpLC).***

TOF-MS spektrometrija se zasniva na jonizaciji rastvora analita čime se formiraju joni koji se ubrzavaju u električnom polju. Brzina njihovog kretanja u ovom polju zavisi od odnosa mase jona ( $m$ ) i njihovog naelektrisanja ( $q$ ) (u skladu sa jednačinom (2)). Separacija se vrši na osnovu različitog vremena ( $t$ ) potrebnog da različiti joni pređu poznato rastojanje do detektora ( $k$ - konstanta proporcionalnosti koja zavisi od dimenzija uređaja).<sup>[234]</sup> Uređaj je sadržao elektrosprej jonizator koji omogućava kontinualnu elektrosprej jonizaciju (ESI) pri atmosferskom pritisku što pruža mogućnost postizanja visoke rezolucije i od posebne je važnosti za analizu farmaceutskih proizvoda. Detekcija je vršena u pozitivnom modu.

$$t = \frac{d}{\sqrt{2U}} \cdot \sqrt{\frac{m}{q}} = k \cdot \sqrt{\frac{m}{q}} \quad (2)$$

Ova metoda je primenjena najpre kao metoda kvalitativne analize kojom je identifikovan klindamicin koji je inkapsuliran u okviru PLGA/HAp kompozitnog materijala. Za tu namenu PLGA i klindamicin iz kompozita PLGA/HAp/klindamicin su rastvoreni u acetonitrilu, dok je nerastvorni HAp iz kompozita odvojen od rastvora filtriranjem kroz poli(tetrafluoro-etilenski) (PTFE) filter (Millipore Corp, USA). Merenja su urađena na Q-TOF Premier™ preletnom masenom spektrometru sa ortogonalnim ubrzanjem (Waters-Micromass, Mančester, UK).

***Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC).*** Tečna hromatografija je primenjena kao metoda kvantitativne analize u cilju određivanja ukupne količine klindamicina koja je inkapsulirana nakon ultrazvučnog procesiranja materijala. Za tu namenu primenjena je indirektna metoda zasnovana na merenju količine antibiotika koja je preostala u supernatantu nakon procesiranja i separacije taloga.



**Slika 3.7:** Kalibraciona kriva zavisnosti površine HPLC pika klindamicina ( $t_{(retencije)} = 5.4$  min) od njegove koncentracije u vodi.

Primenom ove metode određena je količina leka inkapsulirana u okviru PLGA/HAp-a kao i količina leka koju su vezale njegove komponente- PLGA i HAp pojedinačno. Količine inkapsuliranog leka određene su na osnovu kalibracione krive prikazane na slici 3.7 koja je dobijena za rastvore klindamicina u vodi poznatih koncentracija. Dobijene količine antibiotika su omogućile određivanje efikasnosti inkapsulacije primenom jednačine (3). U jednačini (3),  $\delta$  je efikasnost inkapsulacije (%),  $m_0$  odgovara ukupnoj količini klindamicina primenjenoj u toku procesiranja (mg), dok  $m$  odgovara količini klindamicina preostaloj u supernatantu nakon procesiranja (mg).

$$\delta = \frac{(m_0 - m)}{m_0} \cdot 100\% \quad (3)$$

Uzorci su analizirani na tačnom hromatografu Hewlett Packard 1050 sa UV-vis detektorom (HP1050 UV-vis detectors), kvaternom pumpom za eluiranje (Pump System HP 1050) i automatskim doziranjem (Autosampler HP1050). Separacija je vršena primenom podeone hromatografske tehnike pomoću komercijalne reverzibilne kolone C18 (Nucleosil 100-5-C18, Macherey, Nagel) dimenzija 250 x 4.6 x 5 mm. Kao eluent primenjena je smeša acetonitrila i vode zapreminskog odnosa 60:40 v/v. Eluiranje injektirane zapremine rastvora analita od 20  $\mu$ l vršeno je pri brzini protoka mobilne faze od 0.7 ml/min. Izabrana detekciona talasna dužina je bila  $\lambda_{\max}(\xi) = 210$  nm. Analize su ~~date~~ vršene pri sobnim uslovima pritiska i

temperature. Za analizu rezultata primenjen je HP program za HP1050HPLC model hromatografa.

**Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR).** FTIR spektroskopija je primenjena kao dodatna metoda za identifikaciju klindamicina adsorbovanog na površini HAp-a i analizu mogućih fizičkih i/ili hemijskih interakcija između ova dva jedinjenja. Za tu namenu primenjena je KBr tehnika snimanja. Uzorak je homogenizovan sa KBr u molarnom odnosu uzorak:KBr=1 : 1 i presovan u vidu tablete. Snimanje je vršeno u opsegu od 400 do 4000  $\text{cm}^{-1}$  sa rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$ . Spektri su snimljeni pomoću Spectrum One (Perkin Elmer) spektrometra u transmissionom modu i predstavljaju rezultat usrednjavanja 64 skaniranja.

**Skenirajuća elektronska mikroskopija visoke rezolucije (FESEM).** Morfološke karakteristike materijala koji su dobijeni nakon ultrazvučnog procesiranja analizirane su primenom skenirajuće mikroskopije. Na ovaj način analizirani su: morfologija čestica PLGA/HAp-a dobijenih nakon inkapsulacije klindamicina primenom različitih rastvarača i nerastvarača polimera; morfološke karakteristike čestica PLGA/HAp-a sa različitim sadržajem klindamicina; i morfologija čestica komponenti PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom (PLGA/klindamicina i HAp/klindamicina).

Pre snimanja uzorci su dispergovani u vodi nakon čega su filtriranjem naneti na zlatom presvučene polikarbonatne membrane. Provodnost je obezbeđena pomoću tankog površinskog sloja ugljenika. Snimanje je vršeno pomoću SUPRA 35 VP Carl Zeiss skenirajućeg elektronskog mikroskopa.

**Stereološka analiza.** Metoda stereološke analize je primenjena u cilju određivanja raspodela i srednjih vrednosti morfoloških parametara čestica dobijenih nakon inkapsulacije različitih sadržaja leka. Metoda se zasniva na statističkoj analizi morfoloških parametara dobijenih merenjem 2D projekcija čestica na SEM mikrografijama. Parametri koji su bili analizirani su: feret dijametar, površina preseka, izduženost i sferičnost čestica. Za merenje i obradu podataka primenjen je program Image Tool Win 3.0. Analizirani materijali su sadržali 1, 5 i 10% klindamicina inkapsuliranog u okviru PLGA/HAp kompozita.



**Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM).** U cilju analize strukture čestica PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom primenjena je metoda transmisione elektronske mikroskopije. Priprema uzoraka za snimanje je obuhvatala ultrazvučno dispergovanje praha u etanolu koji je zatim nakapavanjem nanet na bakarnu mrežicu. Snimanje je vršeno na JEM-2010F transmisionom elektronskom mikroskopu.

**Fluorescentna mikroskopija.** Snimanje fluorescencije obeleženih materijala vršena su pomoću Carl Zeiss LSM 510 konfokalnog mikroskopa. Fluoresceinamin je pobuđivan pomoću argonskog lasera (488 nm), dok su rodamin i alizarin pobuđivani pomoću helijum-neonskog (He/Ne) lasera (543 nm). Emisija je filtrirana pomoću filtera LP 505-530 nm (za zelenu fluorescenciju) i 560 nm (za crvenu fluorescenciju). Slike su analizirane pomoću Carl Zeiss LSM 3.0 softverskog paketa.

**Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS).** XPS kao kvantitativna spektroskopska tehnika pruža mogućnost određivanja elementarnog sastava, empirijske formule, hemijskog i elektronskog stanja elemenata u materijalu. Kao površinska metoda analize ona omogućava merenje kinetičke energije i broja elektrona koji se, nakon bombardovanja rendgenskim zracima, oslobađaju iz sloja veoma bliskog površini (1-5 nm od površine). Dodatnim tretmanom, koji može da podrazumeva postepeno uklanjanje površinskih slojeva bombardovanjem jonskim snopom, metoda omogućava profilnu hemijsku analizu materijala.<sup>[235]</sup>

Ova metoda je primenjena za površinsku i profilnu hemijsku analizu PLGA/HAp kompozita pre i nakon inkapsulacije klindamicina u cilju analize inkapsulacije leka. Pored toga analiziran je i keramicki deo kompozita pre i nakon procesiranja sa klindamicinom u cilju određivanja mogućnosti adsorpcije leka za njegovu površinu. Pre snimanja svi materijali su kompaktirani u vidu tableta prečnika 6 mm. Uzorci su analizirani pomoću PHI-TFA XPS spektrometra uz primenu aluminijumskog monohromatora. Pored analize šire spektralne oblasti, dodatno su snimljeni visokorezolucioni spektri kiseonika (O1s) i ugljenika (C1s). Profilne analize su vršene uzastopnim bombardovanjem snopom argonskih jona, čime su uklanjani površinski slojevi materijala, i snimanjem spektara dobijenih površina. Argonski jonski snop je imao brzinu uklanjanja površinskog sloja materijala od oko 1.7 nm/min. XPS

spektri su snimani nakon svakog petog ciklusa bombardovanja (nakon svakih 5 minuta). Podaci su analizirani pomoću Multipak 8.0 programskog paketa.

**Metoda merenja ugla kvašenja.** Jedna od metoda za analizu kvašljivosti površine materijala je metoda kapljice (eng. *“sessile drop method”*). Metoda se zasniva na nanošenju jedne kapi vode, poznate zapremine, na površinu materijala i merenju ugla između površine materijala i tangente na površini kapljice vode. Izmereni ugao odgovara stacionarnom uglu kvašenja materijala.<sup>[236]</sup>

Ugao kvašenja meren je na PLGA/HAp kompozitu sa inkapsuliranim klindamicinom, PLGA polimeru sa inkapsuliranim klindamicinom i na PLGA polimeru koji je dobijen ultrazvučnim procesiranjem bez dodatka leka. Za tu namenu uzorci su kompaktirani u vidu tableta dijametra 6 mm. Merenja su vršena nanošenjem jedne kapi vode zapremine 1  $\mu$ L na površinu materijala. Kontaktni ugao je određen pomoću sistema za merenje površinske energije *“Surface Energy Evolution System”* (Advex Instruments, Francuska) koji je opremljen kamerom rezolucije 1 Mpix i namenjen za merenje ugla kvašenja i izračunavanje površinske energije. Za obradu podataka primenjen je program *„See System for Self-cleaning 1.0“* koji uzima u obzir korekciju za asimetrični oblik kapi.<sup>[237]</sup> Svi rezultati predstavljaju usrednjene vrednosti najmanje četiri merenja.

**Metoda merenja zeta potencijala.** U cilju merenja površinskog naelektrisanja čestica primenjena je elektroforetska metoda čiji se princip zasniva na merenju mobilnosti čestica u električnom polju na osnovu koje je moguće izmeriti njihov zeta potencijala (ZetaPlus Analyser, Brookhaven Instruments, SAD). Merenja su vršena na PLGA/HAp kompozitu, PLGA polimeru i HAp-u koji su procesirani bez i sa klindamicinom. Pre merenja uzorci su dispergovani u vodenom rastvoru fosfatnog pufera (1 mM PBS) koji je obezbeđivao konstantnu jonsku jačinu i pri vrednosti pH od 7.2 koja je dodatno podešena pomoću vodenog rastvora natrijum-hidroksida (1 mM NaOH). Sva merenja su urađena sa trostrukim ponavljanjem, a dobijeni rezultati predstavljaju srednje vrednosti ponovljenih merenja.

**Metoda merenja specifične površine.** U cilju merenja specifične površine materijala primenjena je metoda fizičke adsorpcije molekula gasa na površini materijala u čvrstom stanju zasnovana na Brunauer-Emmett-Teller (BET) teoriji.<sup>[238]</sup> Obzirom na termičku osetljivost polimera, merenja su vršena bez prethodne desorpcije površine, dok je za

adsorpciju primenjen azot. Vrednosti specifičnih površina su izmerene na PLGA/HAP kompozitu, PLGA polimeru i HAP-u koji su procesirani sa i bez klindamicina.

### 3.2.5. METODE ZA ANALIZU PROCESA DEGRADACIJE KOMPOZITA I OTPUŠTANJA LEKA

---

**Preletna masena spektrometrija/tečna hromatografija ultravisokih performansi (TOF-MS/UpLC).** TOF-MS spektrometrija (detaljnije opisana u sekciji Metode za karakterizaciju materijala) je u toku analize procesa degradacije primenjena kao metoda kvantitativne analize. Za tu namenu TOF-MS spektrometar je bio redno vezan za UpLC hromatograf i imao je ulogu detektora. Količina prisutnog klindamicina u rastvoru je analizirana u supernatantima koji su dobijeni nakon određenog perioda otpuštanja leka iz PLGA/HAP kompozita u fiziološkim uslovima (po proceduri opisanoj u sekciji Metoda degradacije polimernog dela kompozita i otpuštanja leka). Primenom ove metode istovremeno su praćene koncentracije oba oblika klindamicina- baznog i fosfatnog. Merenja su izvršena u supernatantima iz tri paralelne serije. Konačno dobijene koncentracije leka po danu otpuštanja predstavljaju srednje vrednosti ponovljenih meranja.

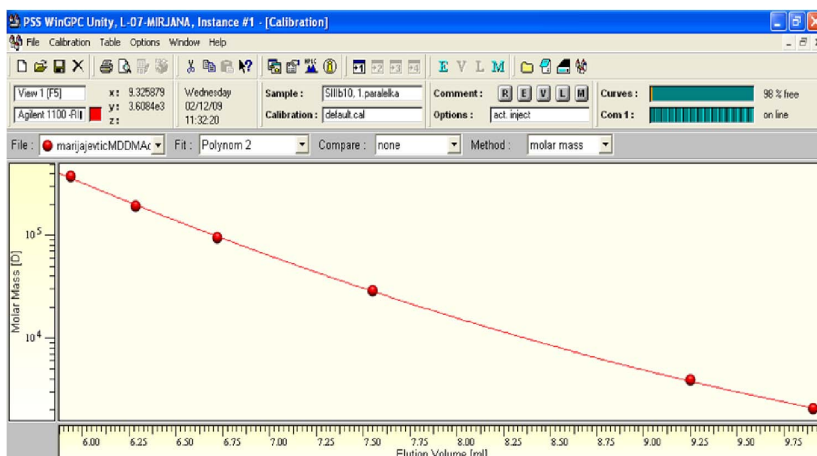
**Gel-propusna hromatografija (GPC).** GPC je metoda koja se često koristi za karakterizaciju makromolekula (proteina i industrijskih polimera) i bazirana je na odvajanju molekula po veličini, odnosno po hidrodinamičkoj zapremini. Ovaj način karakterizacije pruža mogućnost preciznog određivanja srednjih vrednosti i raspodela molekulskih masa makromolekula.

U toku praćenja procesa degradacije polimernog dela PLGA/HAP kompozita i/ili istovremenog otpuštanja leka, ova metoda je primenjena u cilju određivanja promene raspodela molekulskih masa, srednje brojne vrednosti molekulskih masa ( $M_n$ ), srednje masene vrednosti molekulskih masa ( $M_w$ ) i indeksa polidisperznosti ( $M_w/M_n$ ) sa vremenom degradacije. Analizirani su uzorci PLGA/HAP kompozita sa i bez inkapsuliranog leka koji su dobijeni nakon određenog vremenskog perioda degradacije u fiziološkim uslovima (u skladu sa procedurom opisanom u sekciji Metoda degradacije polimernog dela kompozita i otpuštanja leka).

**Tabela 3.1: Kalibraciona tabela korišćena u GPC metodi.**

Uzorak standarda	Molarna masa (kD)	Zapremina eluiranja (ml)	Nagib	Devijacija (%)
<b>PSS 390000</b>	390000.00	5.9355	-0.7674	-3.9834
<b>PSS 200000</b>	200000.00	6.2812	-0.7322	3.0730
<b>PSS 97000</b>	97200.00	6.7197	-0.6875	3.5661
<b>PSS 30000</b>	30000.00	7.5467	-0.6032	-1.8044
<b>PSS 4000</b>	4000.00	9.2472	-0.4299	-2.5549
<b>PSS 2100</b>	2100.00	9.9035	-0.3630	1.9622

GPC merenja su vršena na Hewlett Packard 1100 Series hromatografu sa RI Agilent 1100 detektorom. Primenjene su MIXED-D (American Polymers Standards Corporation) kolona i predkolona dimenzija 300x7.5 mm. Predkolona je sadržala 0.05 M rastvor litijum-bromida (LiBr) u N,N-dietilacetamidu (DMAc). Ovaj tip kolone i pretkolone sadrži široku raspodelu veličina pora i pruža mogućnost precizne detekcije i određivanja sadržaja molekulskih vrsta do 400000 g/mol. Analiza je vršena na sobnoj temperaturi primenom tetrahidrofurana (THF) kao eluenta sa brzinom protoka od 0.8 mL/min. Svi uzorci su rastvoreni u THF-u i naknadno filtrirani kroz PTFE filtre u cilju odvajanja HAp-a. Zapremina rastvora, koncentracije  $2.5 \cdot 10^{-4}$  g/mol, koja je korišćena u toku pojedinačnih merenja bila je 100  $\mu$ L. Standardi koji su omogućili formiranje kalibracione krive, pomoću koje su određene relativne vrednosti srednjih molekulskih masa i raspodele molekulskih masa, bili su PSS (polistirenski standardi) 390000, 200000, 51000, 30000, 2100 u toluenu. Tabela 3.1 predstavlja kalibracionu tabelu, dok je odgovarajuća kalibraciona kriva prikazana na slici 3.8. Obrada podataka je vršena primenom programa WinGPC Unity (Polymer Standards Service- PSS, Nemačka).



**Slika 3.8.** Kalibraciona kriva korišćena u GPC metodi.

**1H i 13C nuklearna magnetna rezonanca (NMR).** NMR spektroskopska analiza primenjena je u cilju određivanja sastava (udela laktidnih i glikolidnih monomernih jedinica) i strukture polimernog dela PLGA/HAP kompozita nakon određenog perioda degradacije u simuliranim fiziološkim uslovima (prema proceduri opisanoj u sekciji 3.2.2. Metoda degradacije polimernog dela kompozita i otpuštanja leka).

Analize su vršene na Varian Unity Inova NMR spektrometru. U cilju snimanja  $^1\text{H}$  NMR spektara primenjeni su 1% rastvori uzoraka u deuterisanom dimetil-sulfoksidu (DMSO- $d_6$ ) pri radnoj frekvenciji od 300 MHz. Ostali radni uslovi su bili: pulsni ugao od  $90^\circ$ , vremenski interval između dva pulsa u trajanju od 5s i dužina koraka snimanja od 5s. Svi spektri su dobijeni sa maksimalno 64 ponavljanja. Za  $^{13}\text{C}$  NMR spektre primenjeni su 35% rastvori uzoraka u deuterisanom dihlormetanu (DCM- $d_6$ ) i radna frekvencija od 75 MHz. Ostali uslovi su bili: pulsni ugao od  $60^\circ$ , vremenski interval između dva pulsa u trajanju od 2s i dužina koraka snimanja od 5s. Svi spektri su dobijeni sa maksimalno 15000 ponavljanja. Spektri su snimljeni na sobnoj temperaturi, korišćenjem NMR staklenih cevi dijametara 5 mm i primenom tetrametilsilana (TMS) kao unutrašnjeg standarda. Za obradu podataka i integraciju pikova primenjen je VNMRJ rev. 1.1D programski paket.

U cilju izračunavanja udela monomernih jedinica u PLGA kopolimeru u toku procesa degradacije primenjeni su  $^1\text{H}$  NMR spektri uz primenu sledećih jednačina:

$$R_{lak} = \frac{I_{lak}}{I_{lak} + I_{glik}} \quad (4)$$

$$R_{glik} = \frac{I_{glik}}{I_{lak} + I_{glik}} \quad (5)$$

U jednačinama (4) i (5)  $R_{lak}$  i  $R_{glik}$  su udeli laktidnih odnosno glikolidnih komonomernih jedinica, dok su  $I_{lak}$  i  $I_{glik}$  integrali dobijeni integracijom pikova laktidnih odnosno glikolidnih monomernih jedinica u PLGA kopolimeru. Udeli komonomernih jedinica su izračunati pomoću integrala pikova CH grupa laktidnih monomera-  $I(CH)_{lak}$  i integrala pikova  $CH_2$  grupa glikolidnih monomera-  $I(CH_2)_{glik}$ .<sup>[239]</sup>

**Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija (DSC).** Termička analiza amorfni polimera pruža mogućnost određivanja temperature na kojoj dolazi do faznog prelaza iz čvrstog amorfno (staklastog) u viskoelastično stanje. Ovaj prelaz je mera pokretljivosti lanaca i veličine njihove slobodne zapremine tako da indirektno može da ukaže na postojanje interakcija kako između polimernih lanaca tako i između inkapsuliranih supstanci i polimernih lanaca.

Termička metoda analize je primenjena u cilju određivanja promene temperature staklastog prelaza polimernog dela PLGA/HAp kompozita, sa i bez inkapsuliranog leka, u toku procesa degradacije. Analizirani su uzorci koji su odgovarali različitim vremenskim intervalima u toku kojih je kompozit bio izložen simuliranim fiziološkim uslovima (u skladu sa procedurom opisanom u sekciji 3.2.2. Metode degradacije polimernog dela kompozita i otpuštanja leka). Za tu namenu primenjen je DSC-Pyris 1 diferencijalni skanirajući kalorimetar opremljen softverom za analizu podataka. Svi uzorci su zagrevani u dva ciklusa. Prvo zagrevanje je urađeno u temperaturnom opsegu između  $-10^{\circ}C$  i  $100^{\circ}C$  pri brzini zagrevanja od  $20^{\circ}C/min$ . Po završetku prvog ciklusa uzorci su ohlađeni velikom brzinom ( $200^{\circ}C/min$ ). Drugi ciklus zagrevanja je urađen u temperaturnom intervalu između  $15^{\circ}C$  i  $200^{\circ}C$  pri jednakoj brzini zagrevanja kao u prvom slučaju i u toku tog ciklusa su snimljeni termogrami.

**Metoda za merenje ugla kvašenja.** Kvašljivost materijala je izrazito povezana sa prirodom grupa koje su prisutne na njegovoj površini koja je u kontaktu sa okolinom. Jedna od metoda koje su primenjene za karakterizaciju površine PLGA/HAp kompozitnog materijala u toku procesa degradacije u simuliranim fiziološkim uslovima je bila metoda kapljice. Ova metoda,

koja je detaljnije opisana u sekciji 3.2.4. Metode za analizu svojstava materijala, omogućila je merenje statičkog ugla kvašenja vodom i određivanje njegove promene u toku različitih perioda procesa degradacije (sekcija 3.2.2. Metoda degradacije kompozita i otpuštanja leka). Svi uzorci su pripremljeni kompaktiranjem u vidu tableta dijametra 6 mm.

**Metoda za merenje zeta potencijala.** Priroda grupa koje su prisutne na površini materijala je vezana za njeno specifično naelektrisanje, koje se aproksimativno meri potencijalom dvojnog elektrodnog sloja na površini čestica (zeta-potencijalom). U daljoj analizi površinskih karakteristika PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom u toku procesa degradacije merena je promena specifičnog naelektrisanja površine. Za tu namenu primenjena je metoda elektroforeze koja je omogućila merenje zeta potencijala čestica na osnovu njihove pokretljivosti (detaljnije u sekciji 3.2.4. Metode za analizu svojstava materijala). Praćenje promene naelektrisanja površine čestica u toku procesa degradacije urađeno je merenjem pokretljivosti čestica PLGA/HAp/klindamicina koje su odgovarale različitim vremenima degradacije u toku prve nedelje analiziranog degradacijskog intervala (sekcija 3.2.2. Metoda degradacije polimernog dela kompozita i otpuštanja leka). Selekcija uzoraka je odgovarala vremenskim intervalima degradacije u simuliranim fiziološkim uslovima nakon kojih su pojedinačne čestice kompozita i dalje mogle biti opažene kako individualno tako i u okviru aglomerata.

**Metoda za merenje specifične površine.** Za analizu procesa degradacije polimernih materijala merenje promene specifične površine je od značaja za definisanje poslednjeg stadijuma u degradacijskom mehanizmu u toku kog dolazi do erozije. Za tu namenu primenjena je metoda merenja specifične površine (BET metoda koja je detaljnije opisana u sekciji 3.2.4. Metode za analizu svojstava materijala). Specifična površina je merena na uzorcima koji su odgovalali različitim vremenskim intervalima u toku kojih je materijal bio prisutan u simuliranim fiziološkim uslovima (sekcija 3.2.2. Metoda degradacije polimernog dela kompozita i otpuštanja leka).

---

### 3.2.6. METODE ZA *IN VITRO* ANALIZU CITOTOKSIČNOSTI MATERIJALA

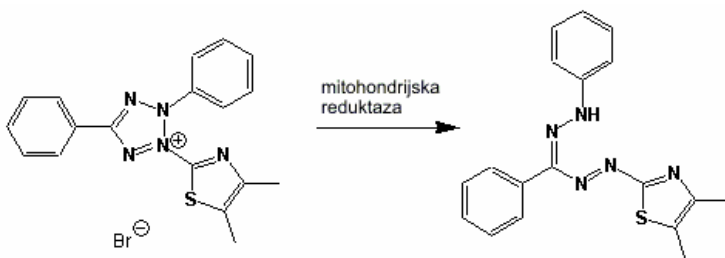
---

**Test isključenja na osnovu bojenja ("Dye exclusion test", DET).** Suština DET testa je mogućnost izrazito brzog odvajanja živih (vijabilnih) i mrtvih i/ili oštećenih (nevijabilnih) ćelija i njihove kvantifikacije na osnovu bojenja citoplazme. Metoda se zasniva na strukturi i

kompaktnosti ćelijske membrane i mogućnosti boja da prođu kroz oštećenu membranu nevijabilnih ćelija i da oboje citoplazmu, dok je kod vijabilnih ćelija ta mogućnost isključena. Nakon bojenja, isključivanjem obojenih ćelija omogućeno je određivanje broja neobojenih na osnovu čega je moguće odrediti stepen preživljavanja.<sup>[240]</sup>

DET metoda je bila jedna od tri metode za analizu citotoksičnosti koje su primenjene za određivanje stepena preživljavanja ćelija (udela preživelih ćelija) nakon izlaganja PLGA/HAP kompozitnom materijalu sa i bez inkapsuliranog klindamicina u toku određenog vremenskog intervala. Sakupljanje ćelija je izvršeno na kraju logaritamske faze rasta. Ćelije su centrifugiranjem brzinom od 200g odvojene od hranljivog medijuma u kom su bile skladištene do početka analize, nakon čega su obojene 1 % rastvorom boje tripan plavo („Trypan blue“). Vijabilne ćelije su odvojene od nevijabilnih, nakon čega su zasađene u plastičnim Petrijevim šoljama u koncentraciji od  $2 \cdot 10^5$  ćelija/ml u kojima su se nalazile tablete PLGA/HAp kompozita u hranljivom medijumu. Analiza je urađena na kompozitnim materijalima sa 1, 5 i 10% inkapsuliranog klindamicina. PLGA/HAp bez inkapsuliranog leka je primenjen kao kontrolni uzorak. U toku inkubacije ćelija zasađenih u prisustvu kompozita sa antibiotikom uzorci su skladišteni u uslovima kontrolisane temperature (37°C) i atmosfere (95% vlage i 5% CO<sub>2</sub>) koji su obezbeđeni u inkubatoru. Nakon inkubacionog perioda koji je trajao 24h, hranljivi medijum je zamenjen svežim i ponovljena je procedura za bojenje tripan plavim. Određivanjem udela preživelih ćelija utvrđen je stepen njihovog preživljavanja nakon kontakta sa uzorcima kompozita koji je mera toksičnog efekta materijala.

**Test redukcije tetrazola (MTT test).** Metoda određivanja citotoksičnosti materijala zasnovana na sposobnosti vijabilnih ćelija da redukuju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid (MTT), žutu boju koja je rastvorna u vodi, u ružičasti produkt formazana koji je nerastvoran u vodi, pomoću mitohondrijske reduktaze (jednačina (6)) je poznata kao MTT test.<sup>[241]</sup>



(6)



MTT test je primenjen kao druga metoda za analizu citotoksičnosti PLGA/HAp kompozita sa i bez klindamicina. Vijabilne ćelije koje su dobijene nakon inkubacije u prisustvu PLGA/HAp kompozita sa 1, 5 i 10% klindamicina su nakon bojenja pomoću tripan plavog i kvantifikacije, zasađene u mikrotitracionim pločama sa 96 radnih mesta u koncentraciji od  $5 \cdot 10^3$  ćelija/100  $\mu$ l. Ploče su inkubirane pod uslovima kontrolisane temperature ( $37^\circ\text{C}$ ), vlage (95%) i atmosfere (5%  $\text{CO}_2$ ) u toku 24, 48 i 72h. Po završetku određenih vremenskih intervala inkubiranja svakom uzorku je dodato 10  $\mu$ l svežeg rastvora MTT-a/radnom mestu nakon čega je inkubacija nastavljena u toku naredna tri sata. Po isteku ovog perioda, svim uzorcima je dodato 100  $\mu$ l rastvora hlorovodonične kiseline (HCl) u izopropanolu koncentracije 0.04M/radnom mestu u cilju rastvaranja redukcijom formiranog taloga, proizvoda formazana. Kolorimetrijska detekcija bojenja vršena je merenjem apsorpcije na radnoj talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm pomoću višekanalnog čitača (Multiscan, MCC/340) sa mogućnošću istovremenog merenja više radnih mesta na mikrotitracionoj ploči. Test je ponovljen tri puta za svaku grupu koja se sastojala od minimalno četiri probe za svaki od tri analizirana sistema.

**Difuzni agar test.** Difuzni agar test je metoda citotoksičnosti zasnovana na bojenju ćelija bojama kao što je neutralno crveno. One imaju sposobnost da budu transportovane kroz membranu živih, vijalnih ćelija nakon čega se unutar njih vezuju za regione koje karakteriše kisela sredina kao što su lizozomi i proliferativna DNK i boje ih intenzivno crveno. Test je razvijen kao brza metoda sa visokim stepenom ponovljivosti koja je u skladu sa zahtevima standardnih procedura za merenje citotoksičnosti. Iz tog razloga je predložena kao standardna metoda za *in vitro* biološku analizu medicinskih uređaja i implantata (ISO 10993-5).<sup>[242]</sup>

Procedura difuzionog agar testa obuhvata zasejavanje ćelija u Petrijevim šoljama u toku logaritamske faze rasta. Nakon inkubacije u hranljivom medijumu pri uslovima kontrolisane atmosfere (5%  $\text{CO}_2$ ), temperature ( $37^\circ\text{C}$ ) i vlage (96%) u toku 24h, medijum je zamenjen hranljivim agrom (1.5% rastvor agra u fosfatnom puferu). Na taj način je postignuto formiranje homogene, tanke prevlake agra na površini ćelija. Dodatkom neutralno crvenog (10 ml, 0.01% rastvor neutralno crvenog u fosfatnom puferu) koji difunduje kroz agar omogućeno je bojenje vijabilnih ćelija. Procedura je primenjena za ispitivanje toksičnosti PLGA/HAp kompozita sa 1, 5 i 10% klindamicina, dok je kompozit bez antibiotika služio kao

referentni materijal. Uzorci su u vidu tableta nanošeni na gornji sloj agarne prevlake nakon čega su inkubirani u kontrolisanim uslovima u toku 24h.

**Tabela: 3.2:** Indeksiranje parametara i definisanje nivoa citotoksičnosti u difuznom agar testu. [242]

Zonski indeks	Opis zone
0	Bez prisustva zone obezbojenja oko ili ispod uzorka
1	Zona ograničena na prostor ispod uzorka
2	Zona proširena manje od 0.5 cm oko uzorka
3	Zona proširena od 0.5-1.0 cm oko uzorka
4	Zona proširena za više od 1.0 cm oko uzorka
5	Zona koja obuhvata celu površinu
Indeks lize	Opis zone
0	Bez promena
1	Manje od 20% zone obuhvaćeno promenama
2	Između 20 i 39% zone obuhvaćeno promenama
3	Između 40 i 59% zone obuhvaćeno promenama
4	Između 60 i 80% zone obuhvaćeno promenama
5	Više od 80% zone obuhvaćeno promenama
Indeks odgovora (zonski indeks/indeks lize)	Interpretacija citotoksičnosti
(0/0)-(0.5/0.5)	Netoksičan
(1/1)-(1.5/1.5)	Blago toksičan
(2/2)-(3/3)	Srednje toksičan
>(4/4)	Izrazito toksičan

Agar test kao standardna metoda analize ima definisane kriterijume za nivo citotoksičnosti koji zavise od tri parametra: (i) zonskog indeksa, koji se odnosi na širinu zone oko materijala formirane usled obezbojavanja nevijabilnih ćelija nastalih kao produkt njegove toksičnosti, (ii) indeksa lize, koji se odnosi na morfološke promene na ćelijama kao što su promena veličine i oblika, modifikacija i degeneracija membrane usled lize i (iii) indeksa odgovora, koji je definisan kao odnos zonskog i indeksa lize određen usrednjavanjem vrednosti dobijenih

nakon višestrukih ponavljanja. Način indeksiranja opisanih parametara i finalno definisanje nivoa toksičnosti sumirani su u tabeli 3.2. [242]

**Optička mikroskopija.** Nakon inkubacije ćelija u toku 24h u prisustvu PLGA/HAp kompozitnog materijala sa 1, 5 i 10% klindamicina, kao i u prisustvu PLGA/HAp kompozita bez antibiotika koji je uzet kao referentni materijal, urađena je histološka analiza. Za tu namenu ćelije su nanete u tankom sloju između dve staklene mikroskopske pločice u cilju zaštite od svetlosnog snopa i snimljenje pri uvećanju od 200X primenom svetlosnog mikroskopa (REICHART).

**Skansirajuća elektronska mikroskopija (SEM).** Morfolološka analiza ćelija adheriranih za površinu PLGA/HAp kompozitnog materijala sa inkapsuliranim klindamicinom nakon inkubacije u periodu od 24h vršena je primenom SEM metode. Materijali kompaktirani u vidu tableta fiksirani su za nosač pomoću karbonske trake i zamrznuti tečnim azotom. Oblaganje uzoraka tankim slojem zlata je primenjeno za postizanje provodljivosti. Uzorci su snimani u modu koji koristi elastično rasejane elektrone (eng. „backscatter mode“) pomoću JEOL-JSS 6460LV skansirajućeg mikroskopa pri niskom vakuumu (50 Pa) i naponu ubrzanja elektrona od 20 kV.

**Statistička analiza.** U cilju obrade podataka koji su se odnosili na kvantitativnu analizu u toku metenja citotoksičnosti materijala, primenjen je Studentov t-test. Za tu namenu korišćen je Sigma plot 11.0 softver uz definiciju statistički značajnih razlika za  $p$  vrednost ispod 0.05.

# REZULTATI

---

**IV**

## **4.1. KARAKTERIZACIJA PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM**

---

Primenom metode ultrazvučnog procesiranja formiran je PLGA/HAp kompozitni materijal u okviru kog je inkapsuliran klindamicin, u obliku aktivne i proaktivne forme leka, koji je izabran kao model za analizu procesa inkapsulacije. Ovaj proces je optimizovan u cilju postizanja pravilnih, uniformnih, sfernih čestica submikronskih dimenzija nosača i efikasne inkapsulacije leka. Obzirom na značaj površine materijala, koja će biti u direktnom kontaktu sa ćelijama okolnih tkiva prilikom njegove praktične primene, tokom karakterizacije posebna pažnja je posvećena analizi površinskih karakteristika.

### **4.1.1. OPTIMIZACIJA PROCESA INKAPSULACIJE KLINDAMICINA U OKVIRU PLGA/HAP KOMPOZITNOG MATERIJALA**

---

U toku optimizacije procesa inkapsulacije klindamicina u okviru PLGA/HAp kompozitnog materijala primenjeni su rastvarači i nerastvarači polimera koje karakteriše mogućnost različite rastvorljivosti antibiotika. U izabranim rastvaračima rastvorljivost klindamicina se povećavala počev od acetona i etanola, preko izopropanola i smeše etanol/voda do vode i acetonitrila.<sup>[251],[252],[253]</sup> U zavisnosti od prirode primenjenih rastvarača/nerastvarača polimera metodu inkapsulacije je moguće podeliti na dva specifična slučaja: (i) inkapsulaciju leka primenom kombinacije dva organska rastvarača, odnosno sistema organski rastvarač/organski nerastvarač polimera (O/O) i (ii) inkapsulaciju leka primenom jednog organskog rastvarača i vode, odnosno sistema organski rastvarač/vodeni nerastvarač polimera (O/V).

#### **4.1.1.1. INKAPSULACIJA PRIMENOM ORGANSKOG RASTVARAČA/ORGANSKOG NERASTVARAČA POLIMERA (O/O)**

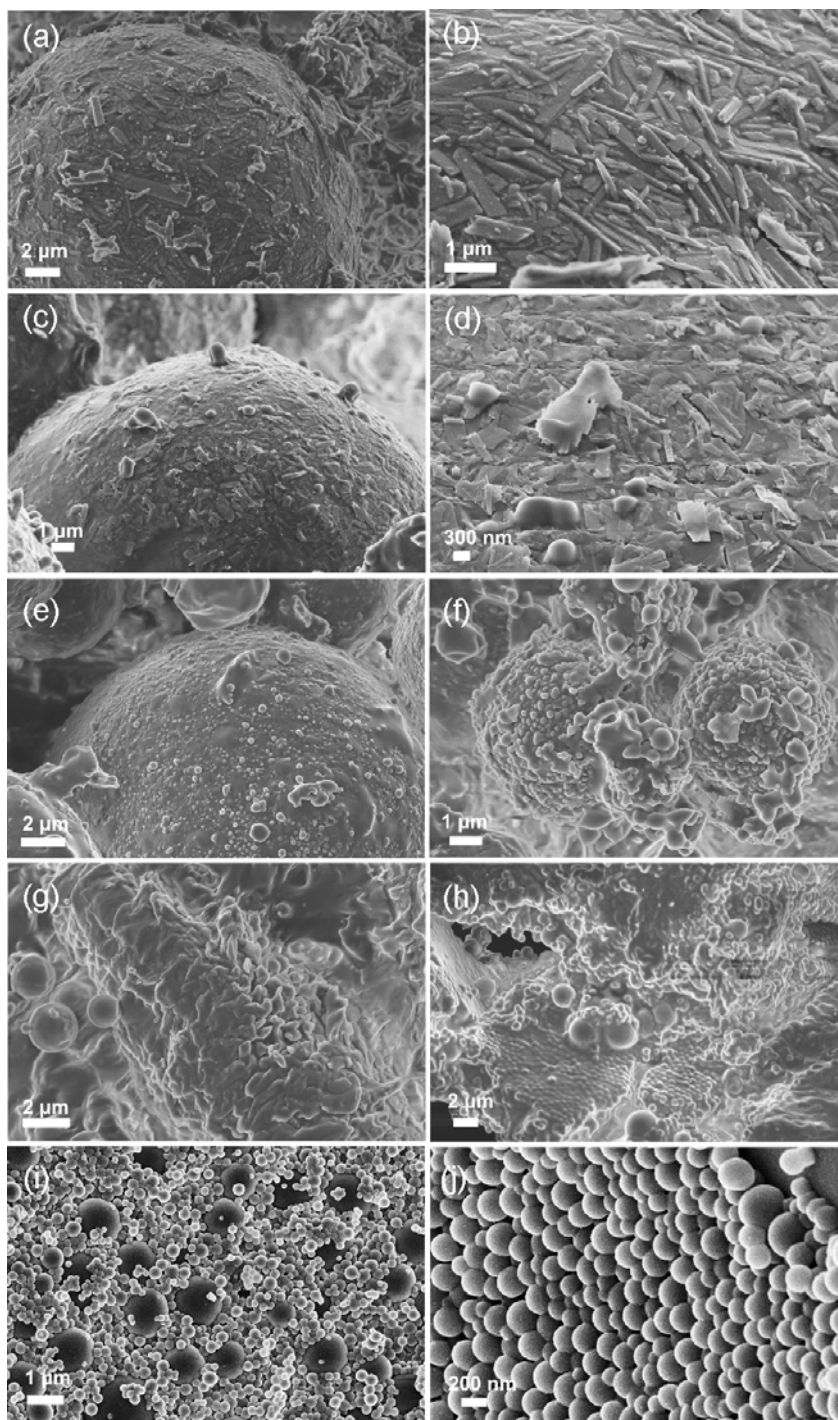
---

Tokom inkapsulacije leka metodom u kojoj su primenjena dva organska rastvarača od kojih je jedan imao funkciju rastvarača a drugi funkciju nerastvarača polimera, kao rastvarači primenjeni su aceton i acetonitril, dok su kao nerastvarači primenjeni koncentrovani etanol, razblaženi etanol (etanol:voda=1:1) i izopropanol. Analizom morfoloških karakteristika sistema koji su dobijeni primenom ove metode utvrđene su značajne razlike kako u veličini i raspodeli veličine PLGA/HAp čestica tako i u morfološkim karakteristikama njihovih površina.

Slika 4.1 pokazuje morfologiju čestica dobijenih primenom sistema aceton: etanol (4.1a,b), izopropanol (4.1c,d), razblaženi etanol (4.1e,f), i sistema acetonitril: izopropanol (4.1g,h), razblaženi etanol (4i,j) kao sistema rastvarač/nerastvarač polimera.

U svim slučajevima u kojima je primenjen aceton, kao dobar rastvarač PLGA i nerastvarač klindamicina, postignuta je morfologija čestica koju odlikuje oblik nepravilnih sfera i veličina od nekoliko desetina mikrona (slika 4.1a,c,e). Morfološke karakteristike površina ovih čestica zavise od nerastvarača polimera. Čestice dobijene primenom etanola (slika 4.1b) i izopropanola (slika 4.1d) imaju štapiće klindamicina vezane za površinu. U sistemu aceton/etanol ovi štapići su mikronskih dimenzija, u sistemu aceton/izopropanol oni su submikronski dok se u slučaju u kom je primenjen aceton/(razblaženi etanol) njihovo prisustvo na površini sfera ne zapaža. Ukoliko se uzme u obzir činjenica da se rastvorljivost klindamicina povećava počev od etanola u kom je nerastvoran, preko izopropanola u kom je delimično rastvoran do razblaženog etanola u kom se rastvara dolazi se do toga da morfološke karakteristike klindamicina i njegova pojava na površini sfernih kompozitnih čestica zavise od njegove rastvorljivosti u izabranom nerastvaraču. Drugim rečima, sa povećanjem rastvorljivosti klindamicina u nerastvaraču veličina čestica klindamicina adsorbovanih za površinu PLGA/HAp-a se smanjuje.

Rastvorljivost klindamicina u nerastvaraču polimera utiče i na strukturu kompozitnih čestica. U slučaju primene razblaženog etanola jasno se zapaža da su mikronske kompozitne čestice izgrađene iz manjih, primarnih, submikronskih sfera (slika 4.1f). Primenom koncentrovanog etanola i izopropanola takva struktura se gubi. Ova promena strukture može se povezati sa koprecipitacijom klindamicina sa polimerom usled smanjenja njegove rastvorljivosti u izabranom nerastvaraču. Precipitacija dodatne faze dalje utiče na submikronske kompozitne čestice koje imaju tendenciju agregiranja, rasta i konačnog formiranja mikronskih sfera.



**Slika 4.1.** Morfologija čestica PLGA/HAp/kлиндamicina dobijenih primenom: acetona/etanola (a,b), acetona/izopropanola (c,d), acetona/(razblaženog etanola) (e,f), acetonitrila/izopropanola (g,h) i acetonitrila/(razblaženog etanola) (i,j) kao sistema rastvarač/nerastvarač polimera. [23]

Kada je aceton zamenjen acetonitrilom, rastvaračem u kome i PLGA i klindamicin imaju veoma dobru rastvorljivost, morfologija dobijenih PLGA/HAp čestica se značajno menja. Najpre se zapaža drastično smanjenje dimenzija čestica koje su u ovom slučaju submikronske i mikronske sfere (4.1g,h,i,j). Stepenn njihove aglomeracije i uniformnost oblika takođe zavise od nerastvarača. U slučaju izopropanola (4.1g,h) submikronske čestice kompozita izrazito su aglomerisane i nepravilnog oblika usled delimičnog srastanja u veće strukture. Sa druge strane, sa povećanjem rastvorljivosti klindamicina u nerastvaraču polimera primenom razblaženog etanola (4.1i,j) morfologiju čestica odlikuju značajno pravilniji oblik i odsustvo aglomeracije. I pored postignute pravilnosti oblika, raspodela veličina čestica nije uniformna i dijametri sfera su u rasponu između 200 nm i 1  $\mu$ m.

#### 4.1.1.2. INKAPSULACIJA PRIMENOM ORGANSKOG RASTVARAČA/VODENOG NERASTVARAČA POLIMERA (O/V)

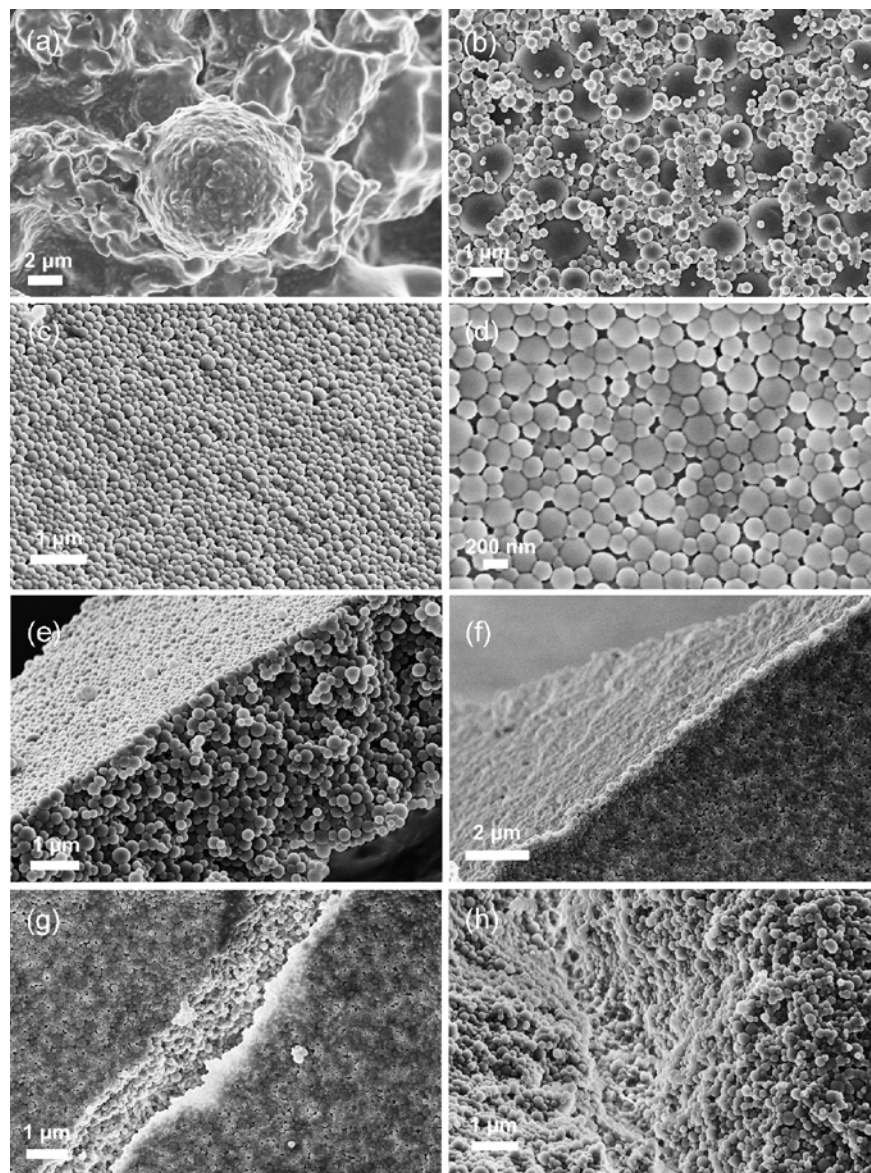
---

Optimizacijom O/O metode inkapsulacije utvrđeno je da rastvorljivost klindamicina u nerastvaraču polimera značajno doprinosi poboljšanju morfoloških karakteristika kompozitnih čestica. Kako on ima prilično dobru rastvorljivost u vodi, u sledećem koraku optimizovana je metoda O/V u kojoj se precipitacija polimera inicira vodom dok je rastvarač polimera jedina organska faza. Na ovaj način dobra rastvorljivost klindamicina u nerastvaraču je održavana konstantnom, dok je njegova rastvorljivost u rastvaraču polimera varirana počev od acetona, preko smeše aceton/acetonitril do acetonitrila. Morfološke karakteristike čestica koje su dobijene primenom ove metode prikazane su na slici 4.2.

Kao i u slučaju varijacije rastvorljivosti u nerastvaraču, varijacija rastvorljivosti klindamicina u rastvaraču polimera uticala je na promenu morfologije kompozitnih čestica. Zanimljivo je da su slične rastvorljivosti rezultirale sličnom morfologijom.

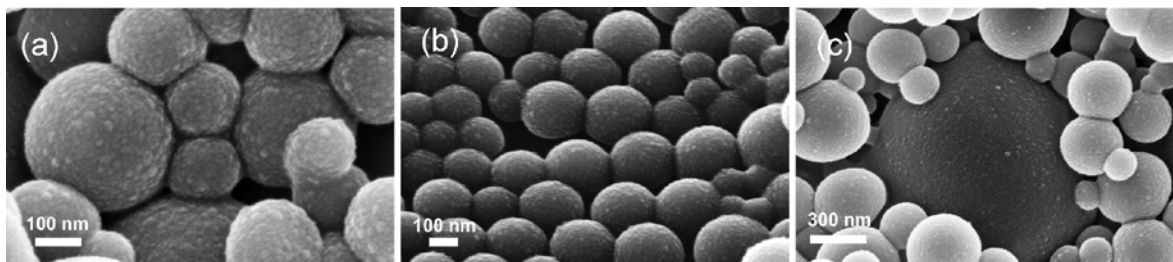
Primenom acetona kao rastvarača polimera konačno dobijena morfologija PLGA/HAp čestica sa klindamicinom (slika 4.2a) veoma je slična prethodno opisanom slučaju u kom je primenjena kombinacija acetona i razblaženog etanola (slika 4.1f). Odlikuju je aglomerati veličine par desetina mikrona, nepravilnog sfernog oblika, izgrađeni iz manjih, delimično sraslih mikronskih sfernih čestica. Kako je klindamicin rastvoran i u vodi i u razblaženom etanolu, dolazi se do toga da je aceton izrazito nepoželjan rastvarač polimera u slučaju inkapsulacije klindamicina.





**Slika 4.2:** Morfologija čestica PLGA/HAp/klindamicina dobijenih primenom: acetona/vode (a), smeše (acetona/acetonitril, 1:1)/vode (b,c) i acetonitrila/vode (d) kao sistema rastvarač/nerastvarač polimera; planarni raspored čestica (e,f) i morfologija na površini i na preseku planarnih struktura (g,h).<sup>[23]</sup>

Primenom smeše acetonitrila i acetona, u kojoj se postiže povećanje rastvorljivosti klindamicina u rastvaraču polimera, zajedno sa vodom kao nerastvaračem polimera dobijena morfologija je veoma slična morfologiji čestica koje su dobijene primenom acetonitrila i razblaženog etanola (slika 4.1i). Čestice su izrazito pravilnog sfernog oblika i bez prisustva aglomeracije (slika 4.2b). Međutim, odlikuje ih prilično široka raspodela veličina jer su pored submikronskih, registrovane i čestice veličine oko jednog mikrona.



**Slika 4.3.** Nanostrukturne čestice PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom.<sup>[23]</sup>

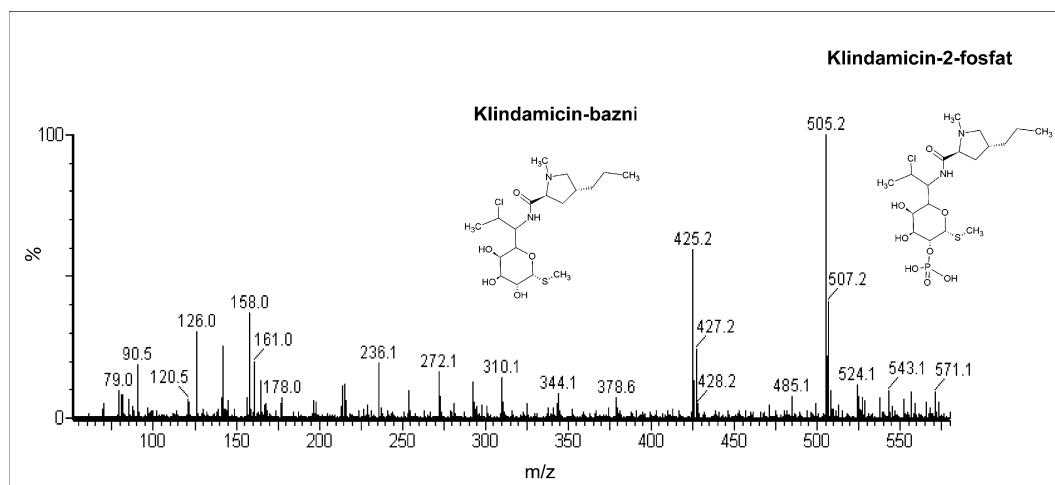
U finalnom koraku primenjeni su acetonitril i voda kao sistem rastvarača i nerastvarača u kome i PLGA i klindamicin imaju veoma dobru rastvorljivost, koja je veća od rastvorljivosti u svim do sada opisanim slučajevima, dobijene su submikronske sferne čestice, pravilnog oblika, bez znakova aglomeracije i sa prilično uskom raspodelom veličina (slika 4.2c,d). Ove sferne čestice imaju pravilnu planarnu organizaciju (slika 4.2e,f). Na površini ovih planarnih organizacija sfere imaju veoma uređen raspored (slika 4.2g), dok se na bočnim stranama ta pravilnost gubi i raspored sfera postaje slučajan i bez geometrijske pravilnosti (slika 4.2h).

Čestice dobijene O/V metodom odlikuje nanostrukturiranost. Ove strukture su izgrađene iz primarnih sfernih čestica veličine do 20 nm (slika 4.3a,b,c). Princip njihovog strukturiranja uporediv je sa principom po kom su strukturirane prethodno pomenute mikronske čestice sa bitnom razlikom koja se odnosi na veličinu primarnih čestica za šta je odgovorna razlika u rastvorljivosti.

Obzirom na najveću pravilnost i uniformnost oblika i veličine čestica koje su dobijene primenom acetonitrila i vode kao rastvarača i nerestvarača polimera, ovaj sistem je izabran kao optimalan i primenjen je u daljoj karakterizaciji materijala.

#### 4.1.2. IDENTIFIKACIJA INKAPSULIRANOG KLINDAMICINA I ODREĐIVANJE EFIKASNOSTI INKAPSULACIJE

U cilju identifikacije klindamicina inkapsuliranog u okviru PLGA/HAp kompozitnog materijala primenjena je metoda preletne masene spektrometrije. Na slici 4.4 prikazan je maseni spektar rastvora PLGA/HAp/klindamicina u acetonitrilu. Spektar pokazuje prisustvo pikova koji odgovaraju karakterističnim protonovanim izotopima sa odnosom mase i naelektrisanja  $m/z = 505.2$  i  $507.2$  koji odgovaraju proaktivnoj formi odnosno klindamicin-2-fosfatu. Molekulska formula ovog jedinjenja je  $C_{18}H_{34}N_2O_8PSCl$  pri čemu je njegova teorijska vrednost  $m/z = 505.1540$  što je u skladu sa izmerenim vrednostima. Pored ove forme, maseni spektar pokazuje prisustvo pikova koji odgovaraju vrednostima  $m/z = 425.2$ ,  $427.2$  i  $428.8$  na osnovu kojih je identifikovano prisustvo protonovanih izotopa aktivne forme odnosno klindamicin-baze. Klindamicin-baza ima molekulska formulu  $C_{18}H_{34}N_2O_5SCl$  i teorijsku vrednos za  $m/z = 425.1877$  koja se takođe slaže sa izmerenim vrednostima. Pored ove dve forme klindamicina, baznog i fosfatnog, nisu detektovani pikovi koji odgovaraju drugim formama klindamicina kao ni produktima njegove razgradnje. Inkapsulirane forme klindamicina jednake su prekursorskim formama što je ukazivalo na to da je u toku primenjene metode inkapsulacije lek ostao stabilan.



**Slika 4.4:** TOF-MS spektar rastvora PLGA/HAp/klindamicina u acetonitrilu. [143]

Kvantifikacija klindamicina u PLGA/HAp materijalu vršena je primenom tečne hromatografije. Na slici 4.5 prikazani su uporedni hromatogrami klindamicina u vodi (4.5a), supernatanta dobijenog nakon procesiranja PLGA/HAp-a bez klindamicina (4.5b) kao i supernatanta dobijenih nakon procesiranja klindamicina sa: PLGA (4.5c), HAp-om (4.5d) i PLGA/HAp kompozitom (4.5e). Integracijom pikova koji odgovaraju klindamicinu određena je njegova koncentracija u supernatantima koja je primenjena za izračunavanje efikasnosti inkapsulacije. U tabeli 4.1 sumirane su inicijalne koncentracije klindamicina koje su primenjene pre procesiranja, kao i rezultati određivanja koncentracija klindamicina u supernatantima nakon ultrazvučnog procesiranja i odgovarajuće vrednosti efikasnosti inkapsulacije. Procesiranje PLGA/HAp kompozitnog materijala sa različitim inicijalno primenjenim sadržajima klindamicina omogućilo je efikasnost inkapsulacije od 30, 35 i 15% čime su formirani PLGA/HAp kompozitni materijali sa 10, 5 i 1% klindamicina respektivno.

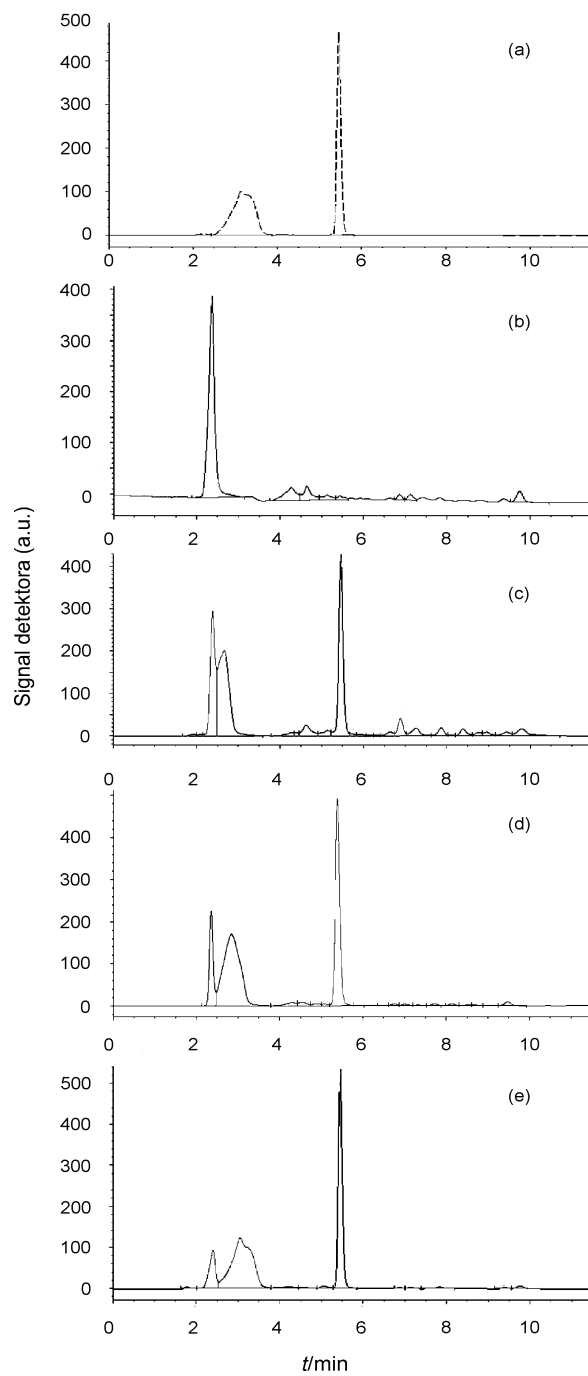
**Tabela 4.1: Količina klindamicina u materijalima dobijena na osnovu rezultata hromatografije.<sup>[23]</sup>**

Uzorak	$m_0^a$ (mg)	$m^b$ (mg)	$\delta^c$ (%)
PLGA/HAp/Klindamicin (c = 10 mas.%)	195.96	59.02	30
PLGA/HAp/Klindamicin (c = 5 mas.%)	97.98	33.90	35
PLGA/HAp/Klindamicin (c = 1 mas.%)	48.99	7.24	15
PLGA/Klindamicin	195.96	79.97	41
HAp/Klindamicin	195.96	54.08	28

<sup>a</sup>  $m_0$ - količina inicijalno dodatog klindamicina pre procesiranja

<sup>b</sup>  $m$ - količina klindamicina zaostala u materijalima nakon procesiranja

<sup>c</sup>  $\delta = m/m_0$ - efikasnost inkapsulacije

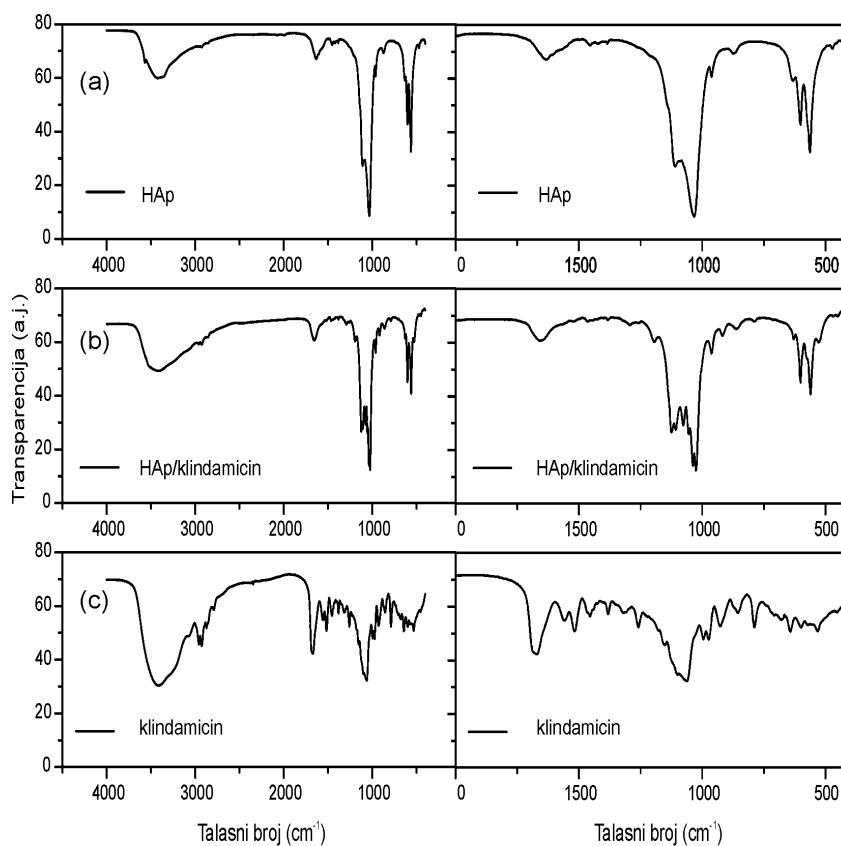


**Slika 4.5.** Hromatogrami klindamicina u vodi (a), supernatanta dobijenog nakon procesiranja PLGA/HAp kompozita bez klindamicina (b) i supernatanta dobijenih nakon procesiranja klindamicina sa: PLGA (c), HAp (d) i PLGA/HAp (e).

Primećeno je takođe da je postojala značajna razlika u inicijalnoj i koncentraciji klindamicina koja je određena nakon njegovog procesiranja sa polimerom odnosno sa apatitom. Ovo je ukazivalo na to da obe komponente PLGA/HAp kompozitnog materijala imaju sposobnost da vežu jedan deo klindamicina. U slučaju PLGA, efikasnost inkapsulacije je bila 41%, dok je HAp imao sposobnost da veže 28% inicijalno primenjenog klindamicina. Poslednji podatak je ukazivao na sposobnost HAp-a da adsorbuje klindamicin za svoju površinu, a ta pretpostavka se zasnivala na tome da je u toku procesiranja HAp primenjen u čvrstoj fazi, dispergovan u smeši rastvora polimera i antibiotika, tako da su isključeni uslovi za njegovu inkapsulaciju unutar prilično uređene apatitne strukture.

Obzirom na to da je indirektnom hromatografskom metodom potvrđena sposobnost HAp-a da veže jedan deo klindamicina iz rastvora u toku procesiranja, adsorpcija klindamicina na površini apatita je dalje analizirana primenom IC spektroskopije. Na slici 4.6 prikazani su IC spektri sonohemijski sintetisanog HAp-a (4.6a), HAp/klindamicina (4.6b) i klindamicina (4.6c), dok su u tabeli 4.2 sumirane sve trake koje su u ovim spektrima identifikovane. Poređenjem navedenih spektara prisustvo klindamicina u HAp/klindamicinu je najpre moguće ustanoviti na osnovu pojave skeletnih vibracija u oblasti „otiska prsta“ koje su zapažene u intervalu talasnih brojeva između 1600 i 600  $\text{cm}^{-1}$ . Skeletne vibracije potiču od vibracija saharidnog i pirolskog prstena koji čine strukturu klindamicina (u skladu sa strukturnom formulom klindamicina na slici 4.4). Grupu traka koja je zapažena u ovom intervalu talasnih brojeva najpre karakterišu istežuće vibracije C=C aromatičnih grupa na 1560  $\text{cm}^{-1}$  koje se u spektru klindamicina pojavljuju u vidu izdvojene trake dok se u spektru HAp/klindamicina zapažaju kao rame, savijajuće vibracije amidne grupe (N-H) u ravni sa trakom na 1518  $\text{cm}^{-1}$  kao i istežuće vibracije ove grupe van ravni sa trakom u intervalu između 750 i 680  $\text{cm}^{-1}$ . U intervalu talasnih brojeva između 1480 i 1360  $\text{cm}^{-1}$  u oba spektra moguće je primetiti trake na 1457  $\text{cm}^{-1}$  i 1382  $\text{cm}^{-1}$  koje odgovaraju C-H deformacionim vibracijama u kombinaciji sa vibracijama aromatičnog saharidnog prstena. Na 1151  $\text{cm}^{-1}$  zapaža se traka istežuće vibracije C-O grupe koja karakteriše saharidni prsten, traka na 1317  $\text{cm}^{-1}$  odgovara savijajućim vibracijama u ravni dok traka na 529  $\text{cm}^{-1}$  odgovara istoj vrsti vibracija O-H grupa aromatičnih primarnih alkohola van ravni. Oštra traka koja odgovara istežućim vibracijama N-C grupe pirolskog prstena na 1258  $\text{cm}^{-1}$  u spektru klindamicina se skoro potpuno gubi u slučaju HAp/klindamicina. Intenzivne trake koje odgovaraju talasnim

brojevima 924, 854 i 785  $\text{cm}^{-1}$  moguće je naznačiti kao savijajuće vibracije C-H grupa aromatičnih prstenova van ravni prstena. Traka na 643  $\text{cm}^{-1}$  u spektru klindamicina odgovara istežućim vibracijama C-Cl grupe i u spektru HAp/klindamicina zapaža se kao rame. U oblasti većih talasnih brojeva u kojoj se javljaju vibracije grupa sa dvostrukim vezama, dodatno je moguće identifikovati traku koja odgovara istežućim vibracijama amidno vezane karbonilne grupe ( $\text{NH-C=O}$ ) sa položajem na 1673  $\text{cm}^{-1}$ , dok je u oblasti jednostrukih veza moguće identifikovati istežuće vibracije C-H grupa vezanih za azot pirolnog prstena (na 2788  $\text{cm}^{-1}$ ), istežuće vibracije alkil C-H grupa (u intervalu između 2950 i 2850  $\text{cm}^{-1}$ ) i istežuće vibracije aromatičnih C-H grupa na 3060  $\text{cm}^{-1}$ . Široka traka sa maksimumom na 3400  $\text{cm}^{-1}$  odgovara istežućim vibracijama O-H grupa aromatičnih alkohola.<sup>[243],[244],[245]</sup>



**Slika 4.6.** IC spektri HAp-a (a), HAp/klindamicina (b) i klindamicina (c).

**Tabela 4.2: Trake HAp-a, HAp/klindamicina i klindamicina identifikovane u IC spektrima.**

Oblast IC aktivnih vibracija	Grupe	Talasni broj (cm <sup>-1</sup> )	HAp	HAp klindamicin	Klindamicin
Istežuće vibracije jednostrukih veza	O-H (alkohol)	3700-2700	-	X	X
	O-H (voda)	3700-2700, 1630	X	X	-
	O-H (rešetke)	3573, 632	X	-	X
	(C=)C-H (aromatični prsten)	3060	-	X	X
	(C-)C-H	2956, 2922, 2873	-	X	X
	(N-)C-H (aromatični prsten)	2788	-	X	X
Istežuće vibracije dvostrukih veza	(NH)C=O	1673	-	X	X
Oblast „otiska prsta“	C=C (aromatični prsten)	1560	-	X	X
	C-H (aromatični prsten)	1458, 1382, 924, 854, 785	-	X	X
	C-O (aromatični prsten)	1151	-	X	X
	N-H u ravni	1518	-	X	X
	N-H van ravni	750, 680	-	X	X
	C-N	1258	-	X	X
	O-H u ravni (prsten)	1317	-	X	X
	O-H van ravni (prsten)	529	-	X	X
Istežuće i savijajuće vibracije jednostrukih veza	C-Cl	643	-	X	X
	P-O (savijajuće)	472, 563, 601, 961, 1032	X	X	X

U sva tri spektra zapažaju se trake PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> grupe koje se javljaju na 472, 563, 601, 961 i 1032 cm<sup>-1</sup>. Traka na 472 cm<sup>-1</sup> odgovara ν<sub>2</sub>, dok trake na 563 i 601 cm<sup>-1</sup> odgovaraju ν<sub>4</sub> savijajućim vibracijama ove grupe. Traka na 961 cm<sup>-1</sup> naznačena je kao ν<sub>1</sub> simetrična istežuća vibracija, dok traka na 1032 cm<sup>-1</sup> odgovara ν<sub>3</sub> vibraciji P-O veze. [15], [16]

Spektar HAp-a pored traka karakterističnih za PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> grupu sadrži i intenzivnu traku koja se proteže od 3000 do 3700 cm<sup>-1</sup> i traku na 1623 cm<sup>-1</sup> koje odgovaraju vibracijama OH<sup>-</sup> grupe vode kao i oštru traku na 3573 cm<sup>-1</sup> koja odgovara istežućoj vibraciji OH<sup>-</sup> jona rešetke. U



spektru HAp/klindamicin ove trake su prekrivene trakama vibracija alkohola i C=O grupe. Slaba traka na  $632\text{ cm}^{-1}$  odgovara ometenoj rotaciji O-H grupe HAp-a i ona se može zapaziti i u spektru HAp/klindamicina.<sup>[15],[16]</sup>

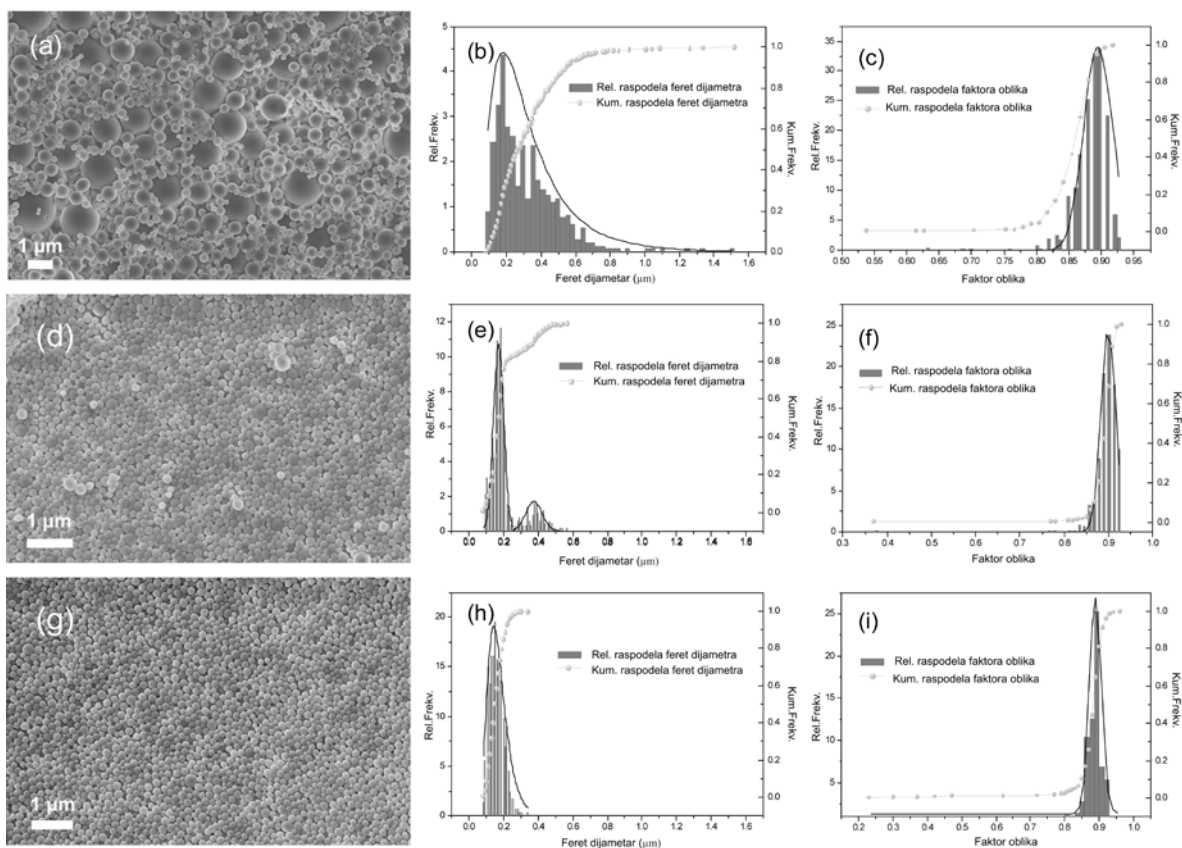
#### 4.1.3. MORFOLOŠKE KARAKTERIASTIKE PLGA/HAP KOMPOZITNOG MATERIJALA SA RAZLIČITIM SADRŽAJEM KLINDAMICINA

Nakon inkapsulacije različitih sadržaja klindamicina u okviru PLGA/HAp-a dešavale su se morfološke promene čestica nosača koje su ukazivale na uticaj leka kao stabilizatora. Poređenjem stereoloških parametara dobijenih analizom čestica PLGA/HAp/klindamicina pruža se mogućnost kvantifikacije razlika u morfološkim karakteristikama u zavisnosti od koncentracije inkapsuliranog antibiotika. Stereološka analiza je vršena na česticama kompozitnog materijala sa 1, 5 i 10% inkapsuliranog leka. Na slici 4.7 prikazane su kumulativne i relativne raspodele feret dijametra i faktora oblika kao i odgovarajuće SEM fotografije PLGA/HAp kompozita sa: 1% (4.7a,b,c), 5% (4.7d,e,f) i 10% (4.7g,h,i) inkapsuliranog klindamicina na kojima je urađena analiza. Srednje vrednosti ova dva parametra zajedno sa faktorom površine i faktorom izduženja za sva tri sistema sumirane su u tabeli 4.3.

**Tabela 4.3: Srednje vrednosti stereoloških parametara čestica PLGA/HAp/klindamicina sa različitim sadržajem inkapsuliranog antibiotika. <sup>[23]</sup>**

Stereološki parametri	10 mas.% <sup>a</sup>	5 mas.% <sup>b</sup>	1 mas.% <sup>c</sup>
Srednja vrednost feret dijametra [nm]	$160 \pm 50$	$190 \pm 50$	$300 \pm 20$
Srednja vrednost površine [ $\mu\text{m}^2$ ]	$0.02 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.02$	$1.14 \pm 0.15$
Srednja vrednost faktora oblika	$0.89 \pm 0.05$	$0.89 \pm 0.03$	$0.89 \pm 0.21$
Srednja vrednostr faktora izduženja	$1.10 \pm 0.10$	$1.09 \pm 0.07$	$0.99 \pm 0.65$

<sup>a, b, c</sup> Koncentracije klindamicina inkapsulirana u okviru PLGA/HAp-a.



**Slika 4.7.** Stereološka analiza morfoloških parametara čestica PLGA/HAP kompozita sa: 1% (a,b,c), 5% (d,e,f) i 10% (g,h,i) klindamicina. [23]

Poređenjem raspodela feret dijametra sfernih čestica PLGA/HAP kompozitnog materijala sa različitim sadržajem klindamicina može se primetiti da promena sadržaja inkapsuliranog antibiotika utiče na njihov oblik i širinu. Raspodele feret dijametra postaju uže sa povećanjem sadržaja inkapsuliranog klindamicina. Za najmanji sadržaj inkapsuliranog klindamicina (1 mas.%) srednja vrednost feret dijametra je 300 nm, dok se sa povećanjem njegovog sadržaja srednja vrednost značajno smanjuje na 190 nm za 5 mas.% i 160 nm za 10 mas.% inkapsuliranog klindamicina. U slučaju poslednja dva sadržaja inkapsuliranog leka i pored veoma sličnih srednjih vrednosti feret dijametra dobijeni su potpuno različiti oblici kriva raspodela. Dok je kriva raspodele feret dijametra za čestice PLGA/HAP-a sa 10 mas.% klindamicina unimodalna, kriva raspodele PLGA/HAP čestica sa 5 mas.% klindamicina je bimodalna, odnosno sadrži određenu frakciju čestica sa feret dijametrima pomerenim ka većim vrednostima.

Srednje vrednosti površine PLGA/HAp čestica pokazuju veoma sličan trend kao u slučaju srednjih vrednosti feret dijametra. Dok su srednje površine kompozitnih čestica sa 10 i 5 mas.% klindamicina slične, vrednost površine koja odgovara česticama sa 1 mas.% inkapsuliranog antibiotika se značajno povećava. Ako se uporede raspodele faktora oblika primećuje se trend ka njihovom sužavanju sa povećanjem sadržaja klindamicina.

Kako su feret dijametar i površina stereološki faktori koji su merilo veličine čestica može se primetiti da povećanje sadržaja klindamicina utiče na veličinu sfernih čestica nosača dok faktori koji su merilo oblika, faktor oblika (sferičnosti) i izduženja sfera, pokazuju manju zavisnost od prisustva količine inkapsuliranog leka. Ova činjenica povlači sa sobom mogućnost dodatne uloge klindamicina u ovom sistemu kao morfološkog stabilizacionog agensa koji utiče na površinske interakcije, sprečava aglomeraciju manjih sfernih čestica kao i njihovo srastanje i formiranje većih.

#### 4.1.4. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE PLGA/HAP KOMPOZITA, PLGA I HAP-A SA KLINDAMICINOM

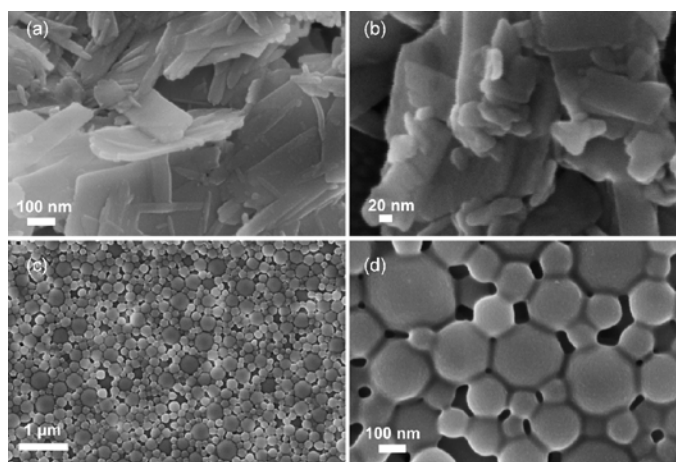
---

Nakon analize uticaja sadržaja inkapsuliranog klindamicina na morfološke karakteristike čestica PLGA/HAp kompozitnog materijala, analizirana je morfologija kako polimernog tako i keramičkog dela kompozita nakon procesiranja sa klindamicinom. Ova analiza je urađena prvenstveno zbog činjenice da oba dela kompozita, i polimerni i keramički, imaju sposobnost da vežu jedan deo klindamicina.

Morfologija HAp-a nakon procesiranja sa klindamicinom izgrađena je iz štapićastih čestica koje su gradile tanke pločaste strukture (4.8a,b). Ova morfologija je veoma slična morfologiji sonohemijski sintetisanog HAp-a<sup>[15]</sup>, sa tom razlikom da nasuprot mikronskim pločicama koje grade štapići HAp-a neposredno nakon sinteze u polju ultrazvuka, dodatno ultrazvučno procesiranje u inertnom medijumu male zapremine (neposredno pre formiranja kompozita) kao i procesiranje u prisustvu klindamicina, kada se jedan deo antibiotika vezuje za njegovu površinu, uzrokuju smanjenje veličina pločastih struktura HAp-a kao i veličinu štapićastih čestica koje ih grade. Ovaj rezultat je prvenstveno u skladu sa sposobnošću ultrazvučnog polja da deaglomeriše formirane agregate, kao i da obezbedi eroziju čvrstih površina čime omogućava njihovo lomljenje na manje delove u toku procesiranja.<sup>[246],[247],[248]</sup> Ova sposobnost ultrazvuka je vezana za parametre procesiranja, vrstu medijuma kao i

geometriju<sup>[246]</sup> tako da je dodatno procesiranje visokointenzitetskim poljem u maloj zapremini inertnog medijuma (etanola), koji odlikuje velika isparljivost odnosno veća sposobnost za formiranje kavitacijskih mehurova, rezultirala redukciju štapićastih čestica HAp-a.<sup>[16]</sup>

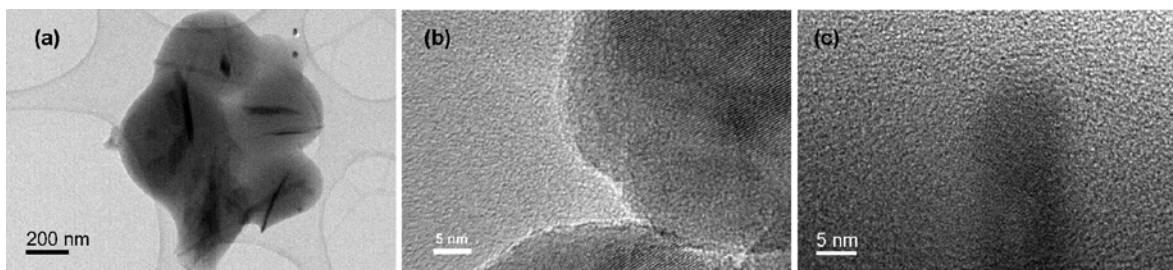
Morfologija PLGA polimera nakon ultrazvučnog procesiranja sa klindamicinom izgrađena je iz sfernih čestica sa veličinom u intervalu između 100 i 300 nm (4.8c,d). U tom smislu formirane čestice polimera veoma su slične česticama PLGA/HAp-a sa 10 mas.% inkapsuliranog klindamicina.



**Slika 4.8.** Morfološke karakteristike HAp-a (a,b) i PLGA (c,d) sa klindamicinom. <sup>[23]</sup>

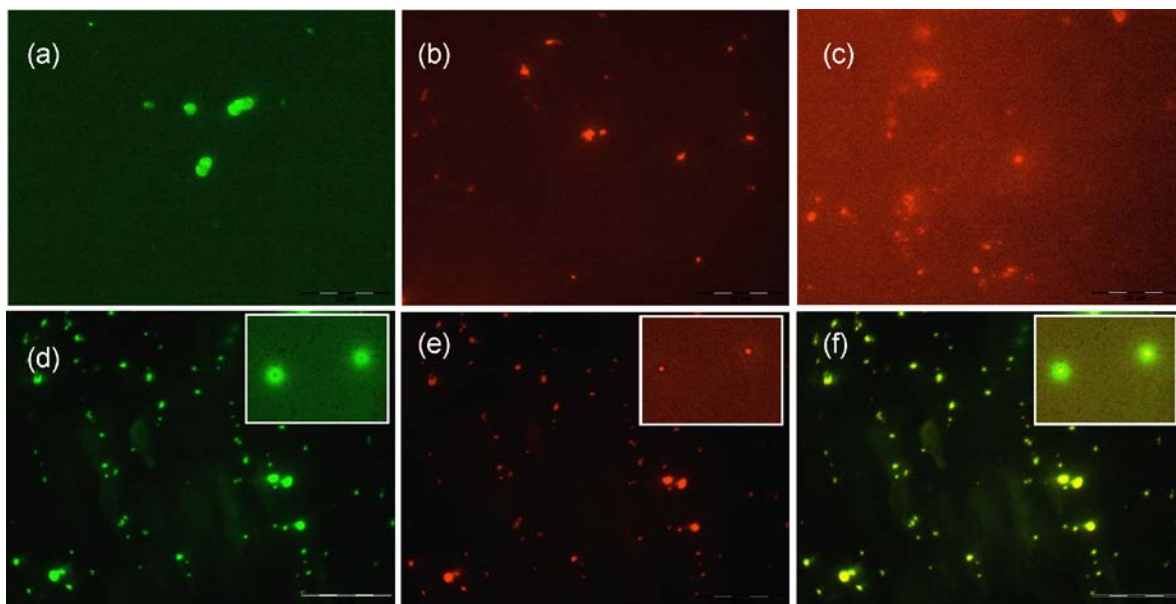
U daljoj analizi ispitivane su strukturne karakteristike PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom primenom TEM mikroskopije. Glavni cilj ovog dela istraživanja odnosio se na istovremenu analizu polimernog površinskog i keramičkog zapreminskog dela PLGA/HAp kompozita sa lekom. Na slici 4.9 prikazane su TEM mikrografije čestica PLGA/HAp/klindamicina na kojima je moguće primetiti štapićaste čestice HAp-a u okviru polimerne matrice (4.9a) i zapaziti kristalne domene njegove strukture u poređenju sa amorfnom polimernom matricom (4.9b,c). Obzirom na to da je struktura kompozita bila izgrađena na taj način da je polimerni sloj oblagao površinu keramičkog dela, utvrđeno je da su kompozitne čestice izgrađene u formi čiju strukturu gradi polimerni omotač i keramičko jezgro koja je poznata kao struktura „omotač-jezgro“. Ova metoda nije pružila mogućnost detekcije inkapsuliranog klindamicina što sa sobom povlači dva moguća razloga: (i) amorfnu strukturu klindamicina u PLGA/HAp kompozitu koju nije moguće detektovati u matrici

amornog PLGA polimera ili (i) molekulsku dispergovanost klindamicina u zapremini polimera i na površini HAp-a.



**Slika 4.9.** TEM mikrografije čestica PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom u koncentraciji od 10 mas.%. [23]

Struktura „jezgro-omotač“ koju poseduje PLGA/HAp sa inkapsuliranim klindamicinom kao i raspodela faza u okviru ovog kompozita dodatno su ispitivani fluorescentnom mikroskopijom. Na slikama 4.10. a, b i c prikazane su fluorescencije pojedinačno obeleženih i procesiranih faza kompozita. Zelena fluorescencija na slici 4.10.a odgovara emisiji fluoresceinom obeleženih PLGA čestica, dok crvena (tamna i svetla) fluorescencija na slikama 4.10 b i c odgovaraju emisiji alizarinom obeleženog HAp-a, odnosno rodaminom obeleženog klindamicina. U slučaju PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom kod koga su sve tri faze fluorescentno obeležene, promenom filtera zapaža se zelena emisija polimera (slika 4.10d), odnosno crvena emisija HAp-a i klindamicina (slika 4.10.e) na osnovu čega se preklapanjem jasno uočava „jezgro-omotač“ struktura kompozita (slika 4.10.f). Uočljiva je zelena emisija polimernog omotača sa izrazito slabom crvenom emisijom inkapsuliranih komponenti koje su delimično skoncentrisane u centralnom delu strukture, a delimično dispergovane u okviru polimerne matrice. Slabljenje intenziteta emisije crveno obeleženih komponenti na slici koja odgovara kompozitu ukazuje na njihovu inkapsulaciju i prekrivanje usled zelene emisije površinskog polimera.



**Slika 4.10.** Slike snimljene primenom fluorescentne mikroskopije: (a) PLGA-fluorescein (zeleni filter), (b) HAp-alizarin (crveni filter), (c) klindamicin-rodamin (crveni filter); PLGA/HAp/klindamicin- (d) zeleni filter, (e) crveni filter, (f) zeleni i crveni filter.

#### 4.1.5. POVRŠINSKE KARAKTERISTIKE MATERIJALA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM

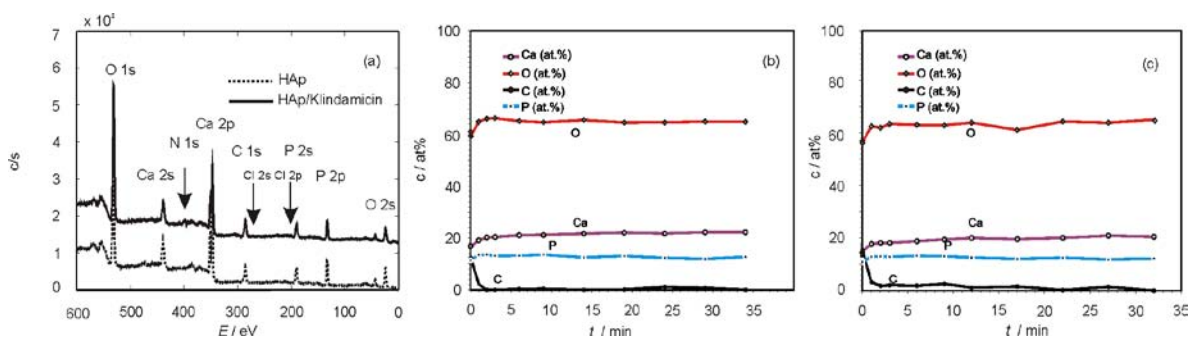
---

##### **Hemija površine i profila**

U cilju analize sastava na površini kao i duž profila materijala, urađene su kvantitativna i kvalitativna hemijska analiza primenom XPS spektroskopije. Na ovaj način analizirani su PLGA/HAp i HAp procesirani sa i bez klindamicina.

Na slici 4.11 prikazani su XPS spektri površine HAp-a sa i bez klindamicina (4.11a) kao i njihovi profili (4.11b i c). U oba slučaja detektovani su fotoelektronski signali kalcijuma (Ca 2s i Ca 2p), fosfora (P 2s i P 2p) i kiseonika (O 2s). Signal ugljenika (C 1s) na 284.6 eV u oba spektra odgovara karbonatima koji su specifični za sonohemijski sintetisan HAp uz primenu uree kao agensa homogene precipitacije<sup>[15]</sup>. Može se primetiti da je veći odnos Ca/C dobijen na površini HAp/klindamicina (Ca/C = 1.6) u odnosu na površinu čistog HAp-a (Ca/C = 1.1). U spektru površine HAp/klindamicina dodatno su registrovani fotoelektronski signali azota na 400 eV kao i signali na 272.5 i 200.7 eV koji odgovaraju hloru (Cl 2s i Cl 2p). Ovi signali odgovaraju klindamicinu i, obzirom na teorijski elementarni udeo hlora i azota u klindamicinu

čija je vrednost 1.6 at% za azot i 3.2 at% za hlor, intenziteti ovih signala su niski. Prisustvo ovih signala u spektru HAp/klindamicina i njihovo odsustvo u spektru HAp-a kao i različit Ca/C odnos pokazuje razliku u hemijskom sastavu površina ova dva materijala koju je moguće pripisati adsorpciji klindamicina. Nakon bombardovanja površine HAp i HAp/klindamicina, čime su postepeno uklanjani tanki slojevi, profilni spektri pokazuju jednak elementarni sastav bez prisustva azota i hlora (4.11b,c). Za razliku od teorijskog atomskog odnosa kalcijuma, fosfora i kiseonika u HAp-u, koji iznose  $\text{Ca/P} = 1.7$  i  $\text{Ca/O} = 0.4$ , u ovom slučaju ti odnosi su  $\text{Ca/P} = 1.5$  i  $\text{Ca/O} = 0.3$  i na površini kao i duž profila ukazujući na prisustvo Ca-deficitarnog HAp-a. U slučaju HAp/klindamicina ovi odnosi su  $\text{Ca/P} = 1.2$  i  $\text{Ca/O} = 0.2$  na površini dok su njihove vrednosti duž profila povećane i odgovaraju vrednostima koje su dobijene za čist HAp. Dobijeni Ca/P i Ca/O odnosi dodatno ukazuju na razliku u sastavu površina HAp-a i HAp/klindamicina kao i sličnost u sastavu njihovih profila čime je potvrđena adsorpcija klindamicina na površini ovog materijala. Slična analiza je primenjena za detekciju adsorpcije bifosfonat-pamidronata na površini prevlaka HAp-a dobijenih plazma-raspršivanjem. [235]



**Slika 4.11.** XPS spektri HAp-a: spektar površine sa i bez klindamicina (a), spektri profila HAp-a (b) i HAp/klindamicina (c). [23]

XPS spektri PLGA/HAp-a sa klindamicinom pokazuju prisustvo fotoelektronskih signala kiseonika (O 1s) i ugljenika (C 1s) kojima odgovaraju elementarni sastavi od 39% za kiseonik i 61% za ugljenik (slika 4.12a). Teorijski elementarni sastav PLGA (50:590) je 44.4% kiseonika (O 1s) i 55.4% ugljenika (C 1s) na osnovu čega je moguće zaključiti da hemijski sastav površine analiziranog PLGA/HAp/klindamicina odgovara polimernom delu kompozita.

Analiza O1s spektra visoke rezolucije pokazuje prisustvo signala koji odgovara energijama od 533.5 eV i 532.1 eV koji se pripisuju kiseoniku u okviru C-O-C i O=C grupa

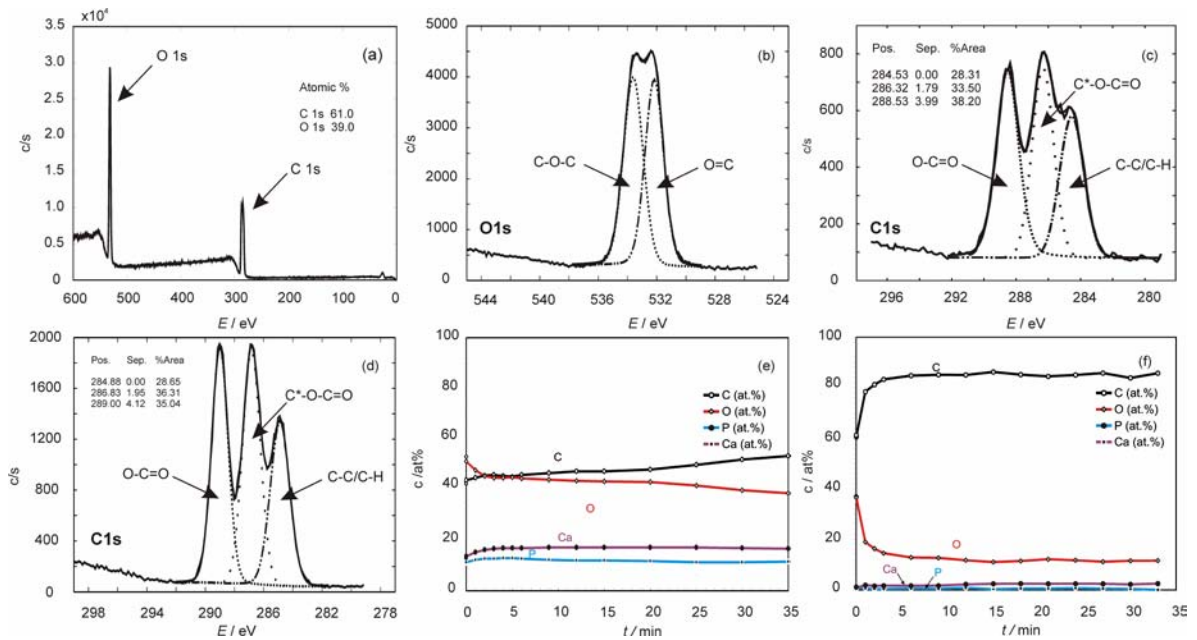
(slika 4.12b). U toku dalje analize na visokorezolucionim C 1s spektrima PLGA/HAP kompozita sa (slika 4.12c) i bez (slika 4.12d) antibiotika prisustvo jednakih signala sa maksimumima koji odgovaraju energijama od 284 eV, 286 eV i 288 eV, u oba spektra dodatno potvrđuje prisustvo PLGA na površini ovih materijala. Uzimajući u obzir hemijsku strukturu PLGA, ovi signali su pripisani ugljeniku u bočnim alkil grupama (C-C ili C-H), ugljeniku iz lanaca (C\*-O-C=O) kao i ugljeniku iz karboksilnih grupa (O-C=O).<sup>[170]</sup> Integracijom signala i izračunavanjem udela svakog od pikova, utvrđen je sadržaj ugljenika koji je iznosio: 28.3% C 1s iz C-C ili C-H grupa, 33.5% C 1s iz C\*-O-C=O i 38.2% C1s iz O-C=O grupa za PLGA/HAP sa klindamicinom. Istom analizom sastava površine PLGA/HAP-a bez antibiotika dobijeno je 28.7% C 1s iz C-C ili C-H grupa, 36.3% C 1s iz C\*-O-C=O i 35.0% C1s iz O-C=O grupa. Poređenjem sadržaja ugljenika u pojedinačnim grupama na površini materijala sa i bez antibiotika primećena su određena odstupanja u sastavu koja su pokazivala povećanje sadržaja karboksilnog ugljenika kao i smanjenje sadržaja ugljenika iz lanca u slučaju materijala sa klindamicinom dok je sadržaj ugljenika iz bočnih alkil grupa ostao nepromenjen. Obzirom na činjenicu da je u toku procesiranja kompozita i inkapsulacije antibiotika za precipitaciju polimera primenjena voda veći sadržaj polarnih grupa na površini oba materijala je očekivan. Sa druge strane, sa precipitacijom polimera istovremeno se dešavala inkapsulacija hidrofilnog leka što je moralo da utiče na reorganizaciju polarnih grupa između površine i unutrašnjosti kompozita.

Profilni hemijski sastav PLGA/HAP kompozita bez antibiotika, koji je prikazan na grafiku 4.12e, pokazuje da je odnos ugljenika i kiseonika na površini 0.8 kao i to da ovaj odnos duž profila raste ukazujući na veći sadržaj ugljenika u unutrašnjosti materijala. U slučaju površine PLGA/HAP-a sa klindamicinom odnos C/O je veći, iznosi 1.6, i ima isti trend rasta duž profila (4.12f). Ukoliko se razmotri odnos Ca/P duž profila kompozita sa i bez klindamicina on je konstantan. Na površini PLGA/HAP-a sa klindamicinom prisustvo ovih elemenata nije zapaženo, dok je njihovo prisustvo u niskoj koncentraciji zabeleženo na površini PLGA/HAP bez antibiotika. Ova niska koncentracija Ca i P na početku profila kompozita ukazuje na moguće prisustvo HAP-a blizu površine materijala dok je odsustvo ovih elemenata u kompozitu sa antibiotikom indikacija njegovog prisustva u unutrašnjosti.

Azot i hlor su registrovani u svim spektrima duž profila PLGA/HAP/klindamicina ukazujući na prisustvo antibiotika kako blizu površine tako i u unutrašnjosti materijala. Slično



zapažanje zasnovano na prisustvu signala azota istaknuto je i nakon analize inkapsulacije paklitakcela u okviru PLGA čestica.<sup>[249]</sup> Usled niskog intenziteta fotoelektronskog signala azota, njegovu koncentraciju duž profila nije moguće precizno odrediti tako da se njegovo prisustvo upotrebjeno samo u cilju potvrde prisustva klindamicina u okviru strukture kompozita.



**Slika 4.12.** XPS spektri: površine PLGA/HAp/klindamicina (a), O 1s (b) i C 1s (c) visokorezolucioni spektri površine; C 1s spektar PLGA/HAp bez klindamicina (d); profilni spektri PLGA/HAp-a bez (e) i sa (f) klindamicinom. <sup>[23]</sup>

### Površinska svojstva

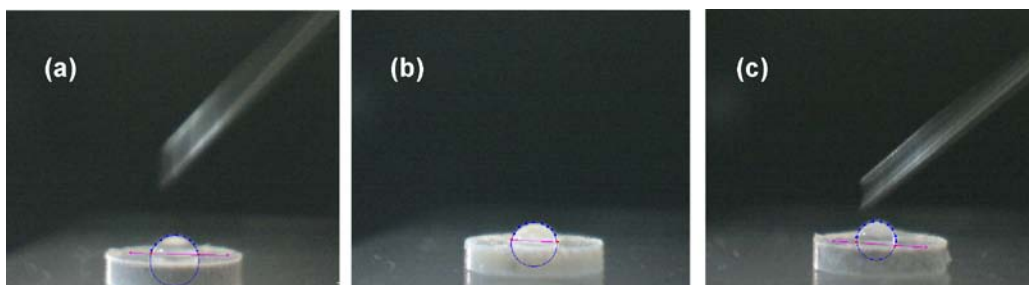
Sledeći korak u karakterizaciji površinskih karakteristika odnosio se na analizu specifične površine, kvašljivosti i površinskog naelektrisanja za koje je već istaknuto da imaju važnu ulogu u budućoj primeni materijala.

Sa stanovišta specifične površine, najpre se zapaža da HAp ima relativno visoku vrednost površine koja se sa izgradnjom kompozita smanjuje. Glavni razlog toga je oblaganje čestica HAp-a, koje odlikuju nanometarske dimenzije, polimernim omotačem usled čega se grade sfere većih dimenzija. Sa druge strane, u slučaju oba materijala nakon procesiranja sa klindamicinom, pri čemu se formiraju PLGA/HAp/klindamicin i HAp/klindamicin, specifična

površina se povećava. To ukazuje na ulogu klindamicina u stabilizaciji veličina i prevenciji aglomeracije ovih čestica.

Sličan trend promene površinskih svojstava zapaža se i prilikom analize kvašljivosti ovih materijala. U toku ove analize razmatraju se dva slučaja koja zavise od vrednosti ugla kvašenja ( $\Theta$ ). Za vrednosti  $\Theta > 90^\circ$  materijal se klasifikuje kao hidrofilan, dok je za vrednosti  $\Theta < 90^\circ$  hidrofoban. [237] Ukoliko se krene od ove podele poređenjem kvašljivosti PLGA/HAp-a, PLGA/HAp/klindamicina i PLGA/klindamicina (slika 4.13) i srednjih vrednosti njihovih uglova kvašenja (tabela 4.4) dobijeni materijali su na granici između hidrofilnih i hidrofobnih i pokazuju promenu kvašljivosti u zavisnosti od sastava. Kvašljivost površine PLGA se menja u zavisnosti od vrste supstance koja je u okviru njega inkapsulirana, odnosno nakon inkapsulacije HAp- postiže se niža kvašljivosti u poređenju sa inkapsulacijom klindamicina. U isto vreme ako se uporede vrednosti uglova kvašenja PLGA/HAp kompozita i PLGA/HAp/klindamicina primećuje se povećanje kvašljivosti u slučaju kada je u kompozitu prisutan antibiotik što je u dobrom slaganju sa različitom preraspodelom površinskih polarnih grupa koja je zapažena prilikom XPS analize površine ova dva materijala.

Kada je reč o naelektrisanju površine, sudeći po vrednostima zeta potencijala, HAp i PLGA čestice su negativno naelektrisane (tabela 4.4). Postojanje razlike u apsolutnim vrednostima naelektrisanja ovih čestica omogućava njihovo uzajamno privlačenje i formiranje kompozita. Rezultujuće čestice PLGA/HAp kompozita su takođe negativno naelektrisane sa apsolutnom vrednošću naelektrisanja između vrednosti naelektrisanja sastavnih komponenti, bliže vrednosti naelektrisanja površine polimera koji čini površinu „omotač-jezgro“ strukture kompozita. Sličan trend se primećuje i nakon dodatka klindamicina kao dodatne faze u HAp, PLGA i PLGA/HAp materijalima pokazujući porast apsolutne vrednosti površinskog naelektrisanja ovih materijala sa dodatkom antibiotika. Za razliku od promene površinskog naelektrisanja PLGA i PLGA/HAp čestica sa klindamicinom koja je neznatna, površinsko naelektrisanje čestica HAp-a menja se znatno što je direktna posledica adsorpcije klindamicina na njegovoj površini.



**Slika 4.13.** Kvašenje PLGA/klindamicin (a), PLGA/HAp/klindamicin (b) PLGA/HAp (c) materijala dobijenih nakon procesiranja u polju ultrazvuka.

**Tabela 4.4:** Rezultati određivanja specifičnih površina, uglova kvašenja i z-potencijala ultrazvučno procesiranih materijala sa i bez inkapsuliranog klindamicina.

Uzorak	Specifična površina (m <sup>2</sup> /g)
PLGA/HAp	1.1
PLGA/HAp/klindamicin 10%	8.9
HAp	30.4
HAp/klindamicin	45.6

Uzorak	Ugao kvašenja (°)
PLGA/HAp	92
PLGA/HAp/klindamicin 10%	89
PLGA/klindamicin	74

Uzorak	Z-potencijal (eV)
PLGA	-37
PLGA/HAp	-24
HAp	-7
PLGA/klindamicin	-40
PLGA/HAp/klindamicin 10%	-29
HAp/klindamicin	-17

## **4.2. ANALIZA PROCESA DEGRADACIJE PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM I OTPUŠTANJA LEKA**

---

Nakon inkapsulacije klindamicina u okviru PLGA/HAp kompozitnog materijala primenom metode ultrazvučnog procesiranja analizirane su kinetike dva uzajamno vezana procesa: degradacije polimernog dela kompozita i simultanog otpuštanja leka. U toku ovih procesa praćene su promene karakteristika materijala sa stanovišta morfologije, strukture, molekulskih masa, termičke stabilnosti i površinskih osobina. Povezivanje promena ovih karakteristika materijala je od interesa za analizu mehanizma degradacije kompozita i otpuštanja leka.

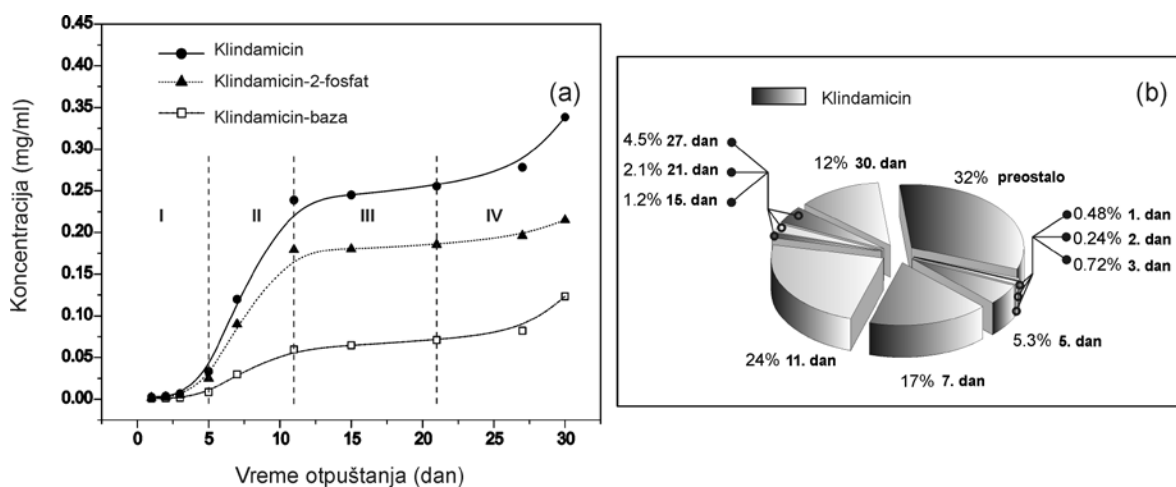
### **4.2.1. ANALIZA OTPUŠTANJA KLINDAMICINA IZ PLGA/HAP KOMPOZITNOG MATERIJALA I SA POVRŠINE HAP-A**

---

U toku analize kinetike otpuštanja aktivne supstance iz PLGA/HAp kompozitnog nosača u *in vitro* uslovima u kojima su simulirani fiziološki parametri, pored ukupne količine otpuštenog klindamicina, praćene su i koncentracije otpuštanja obe, proaktivne i aktivne, forme leka pojedinačno. Na slici 4.14a prikazana je kumulativna kriva otpuštanja ukupnog klindamicina zajedno sa krivama otpuštanja njegove fosfatne i bazne forme. Krive prate promenu koncentracije leka u periodu od 30 dana. Na slici 4.14b grafički su prikazane relativne koncentracije ukupnog klindamicina koji se otpušta u toku određenih vremenskih intervala kao i količina klindamicina koja zaostaje u materijalu nakon analiziranog perioda od 30 dana u toku kog je otpuštanje leka praćeno.

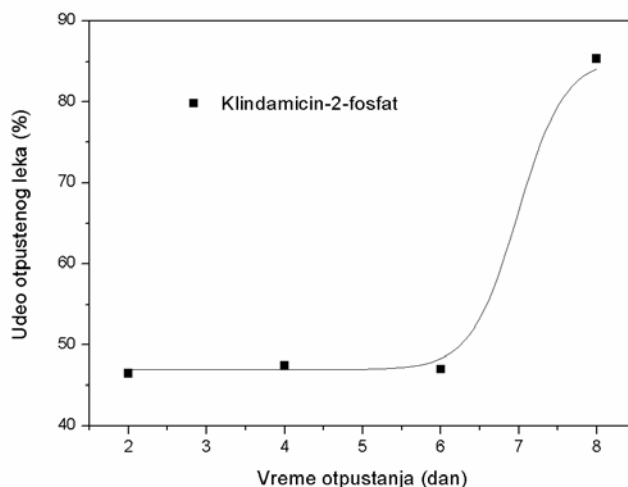
Krive otpuštanja pokazuju vremenske intervale koje odlikuje različita brzina otpuštanja leka tako da su iz tog razloga podeljene u četiri segmenta koji su na slici 4.14a označeni rimskim brojevima. U toku prva tri dana otpušteno je do 1.5% ukupnog klindamicina što je naznačeno kao segment I. U periodu između 3. i 11. dana započinje različita brzina otpuštanja fosfatne i bazne forme klindamicina. Za razliku od značajnog povećanja količine otpuštenog klindamicin-2-fosfata, povećanje brzine otpuštanja klindamicin-baze je sporije što je naznačeno kao segment II. Ovaj period odgovara vremenskom intervalu u toku kog je otpuštena najveća količina ukupnog klindamicina. Do kraja prve nedelje otpuštena je četvrtina ukupne količine inkapsuliranog klindamicina i isti trend se nastavlja u toku druge nedelje analiziranog perioda. Nakon ovog perioda, u toku treće nedelje otpuštanje obe forme

klindamicina se usporava i krive postižu plato koji je označen kao segment III. U toku četvrte nedelje analiziranog perioda primećuje se ponovno povećanje brzine otpuštanja obe forme leka. Njemu odgovara trend koji je veoma sličan trendu otpuštanja koji je primećen na početku odnosno nakon prvih par dana analize. U toku ovog perioda, koji je naznačen kao segment IV, primećuje se povećanje brzine otpuštanja klindamicin-baze, dok se klindamicin-2-fosfat otpušta sporije. Nakon perioda od 30 dana otpušteno je 68% od ukupne količine klindamicina koja je inkapsulirana u okviru PLGA/HAp nosača.



**Slika 4.14.** Kumulativne krive otpuštanja ukupnog klindamicina (●), klindamicin-2-fosfata (▲) i klindamicin-baze (□) u toku vremena (a); relativna količina ukupnog klindamicina otpuštena u toku vremena (b).<sup>[143]</sup>

Pored otpuštanja klindamicina iz PLGA/HAp kompozitnog materijala, u kom je HAp prisutan u okviru PLGA polimerne matrice, dodatno je praćeno i otpuštanje leka iz HAp/klindamicina bez polimera. U ovom slučaju dešavalo se rastvaranje klindamicina sa površine HAp-a na kojoj je on adsorbovan. Grafik na slici 4.15 predstavlja profil klindamicina desorbovanog sa površine HAp-a predstavljen kao udeo otpuštene količine leka u odnosu na primarno adsorbovanu u toku vremena. Kriva otpuštanja pokazuje prilično veliku brzinu desorpcije leka sa površine keramičke faze. Inicijalno se otpušta oko 45% od ukupne vezane količine leka. Nakon prvih šest dana udeo otpuštenog klindamicina neznatno varira nakon čega se do osmog dana otpusti više od 85% površinski vezanog klindamicina.



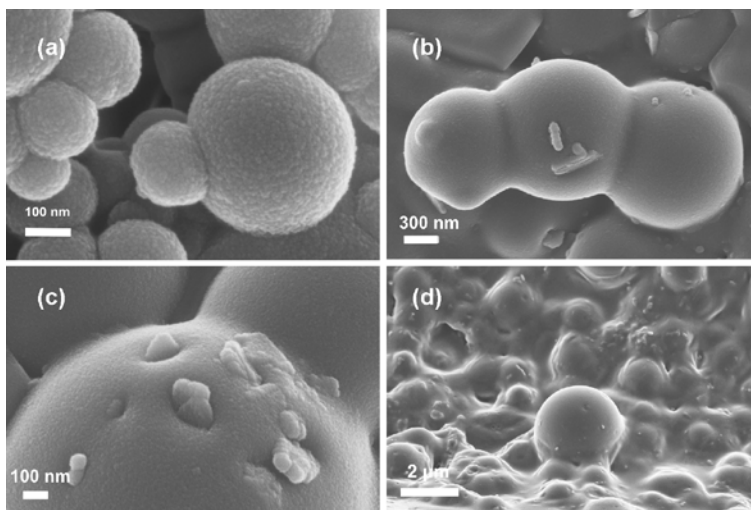
**Slika 4.15.** Kumulativna kriva otpuštanja klindamicin-2-fosfata sa površine HAp-a.

#### 4.2.2. MORFOLOŠKE PROMENE PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM U TOKU PROCESA DEGRADACIJE

---

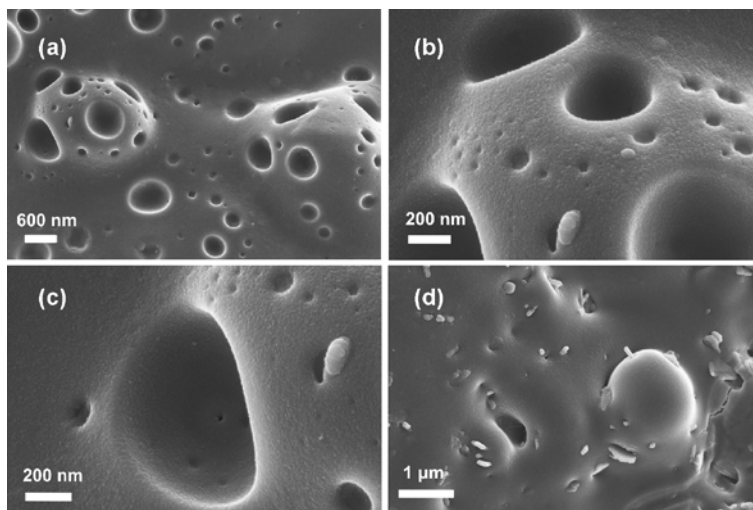
Kao što je ranije već prikazano pre početka procesa degradacije u toku kog se dešavalo kontrolisano otpuštanje leka, morfologiju PLGA/HAP/klindamicina gradile su sferne čestice submikronskih dimenzija koje su imale „omotač-jezgro“ strukturu. Čestice su imale tendenciju građenja planarnih struktura čije su sastavne jedinice bile pravilno uređene sfere uniformnog oblika i veličine.

U toku prvih par dana inkubacije materijala u degradacijskom medijumu, (koji odgovaraju segmentu I krive otpuštanja leka (slika 4.14a)), primarno formirane čestice imaju tendenciju formiranja agregata. Obzirom na prisustvo vodene sredine, sferne čestice manjih dimenzija uzajamno srastaju gradeći veće (slika 4.16a). Sekundarno formirane sferne čestice i dalje pokazuju nestabilnost u vodenom okruženju fosfatnog pufera zbog čega pokazuju dalji rast (slika 4.16b). U toku ovih naglih promena morfologije i rasta čestica dolazi do pojave štapićastih čestica HAp-a na površini polimernog omotača (slika 4.16c). Progres promene morfologije je veoma brz tako da se do kraja ovog segmenta primarne sferne čestice, koje i dalje mogu biti zapažene kao intenzivno aglomerisane sfere, nalaze na putu formiranja morfologije kompaktnih planarnih struktura (slika 4.16d).



**Slika 4.16.** Morfološke karakteristike PLGA/HAp/klindamicina nakon prvih pet dana degradacije (segment I na slici 4.14): agregacija manjih (a) i većih (b) sfernih čestica, pojava štapića apatita na površini sfernih čestica (c) i početak formiranja morfologije kompaktnih planarnih struktura (d).<sup>[143]</sup>

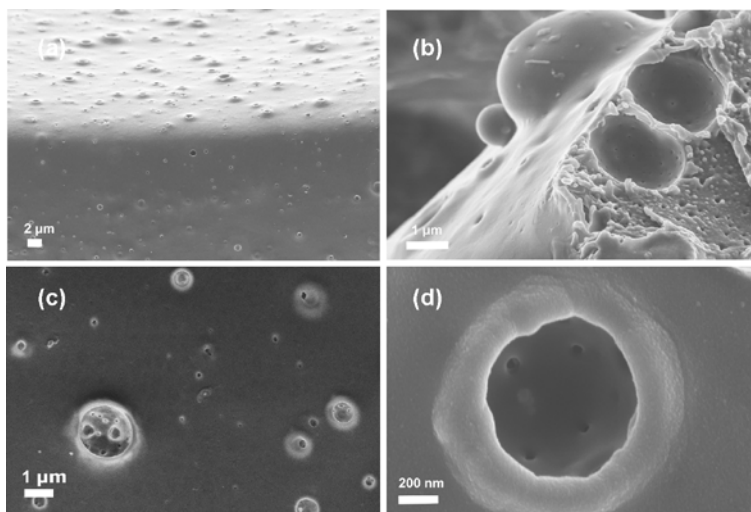
U periodu između 5. i 11. dana procesa degradacije (koji odgovara segmentu II krive otpuštanja leka (slika 4.14a)), morfologija nastavlja sa promenama koje se mogu okarakterisati na dva načina. Najpre je zapažena pojava spoljašnjih pora kako na površini sfernih čestica čije se prisustvo i dalje moglo zapaziti tako i na filmu koji je povezivao susedne, aglomerisane i delimično srasle sferne čestice (slika 4.17a). Neke od ovih pora su prilično velikih dimenzija, dijametra do 500 nm, dok su druge manje sa dijametrom veličine par desetina nanometara (slika 4.17b). Pored spoljašnjih, površinskih, primećeno je i prisustvo unutrašnjih pora koje su veoma malih dimenzija i koje su se nalazile na zidovima unutar velikih površinskih pora (slika 4.17c). Do kraja ovog segmenta, najveći deo materijala dobija morfologiju kompaktnih planarnih struktura nepravilne površine (slika 4.17d).



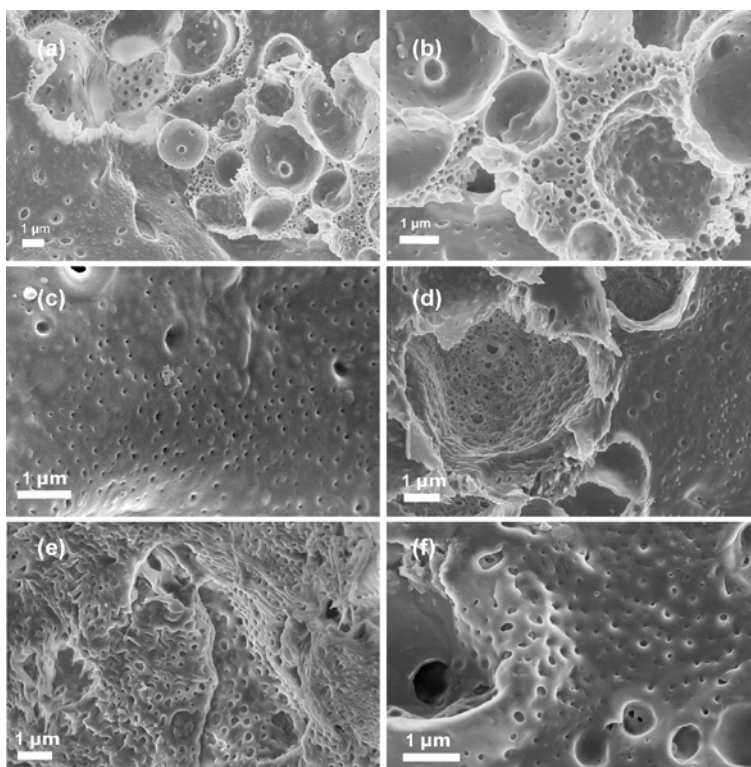
**Slika 4.17.** Morfološke karakteristike PLGA/HAp/clindamicina u periodu između 5. i 11. dana degradacije (segment II na slici 4.14): spoljašnje pore na površini i oko sfernih čestica (a), prisustvo velikih i malih površinskih pora (b), prisustvo malih unutrašnjih pora (c) i morfologija kompaktnih planarnih struktura (d).<sup>[143]</sup>

U toku trećeg segmenta degradacijskog procesa koji je trajao u periodu između 11. i 21. dana, pojedinačne sferne čestice više nisu mogle biti zapažene tako da se umesto prvobitno formiranih planarnih struktura koje su gradile male sferne čestice, formirala morfologija glatkih, kompaktnih planarnih struktura (slika 4.18a). Primećena je i razlika u morfološkim karakteristikama površine materijala koja je bila u direktnom kontaktu sa vodenim rastvorom fosfatnog pufera u odnosu na unutrašnjost materijala (slika 4.18b). Nasuprot ravnoj površini, morfologiju unutrašnjosti ovih planarnih struktura i dalje je karakterisalo prisustvo malih individualnih sfernih čestica. One su gradile neku vrstu matrice u kojoj su bile formirane velike pore koje su karakterisali dijametar od nekoliko mikrometra i glatke površine (slika 4.18c). Površina ovih planarnih struktura bila je prekrivena velikim porama veličine do 2  $\mu\text{m}$ . One su bile znatno veće u odnosu na površinske pore koje su zapažene u prethodnom segmentu i unutrašnjost svake od njih karakterisalo je prisustvo unutrašnjih pora koje su takođe bile većih dimenzija nego što je to bilo zapaženo u prethodnom segmentu (slika 4.18d).





**Slika 4.18.** Morfološke karakteristike PLGA/HAp/clindamicina u periodu između 11. i 21. dana degradacije (segment III na slici 4.14): porozna površina planarnih struktura (a), razlika u morfologiji površine i unutrašnjosti materijala (b), spoljašnje (c) i unutrašnje (d) pore.<sup>[143]</sup>



**Slika 4.19.** Morfološke karakteristike PLGA/HAp/clindamicina u periodu između 21. i 30. dana degradacije (segment IV na slici 4.14): značajno povećanje površinskih i unutrašnjih pora (a,b,c,d) i formiranje poroznih filmova (e,f).<sup>[143]</sup>

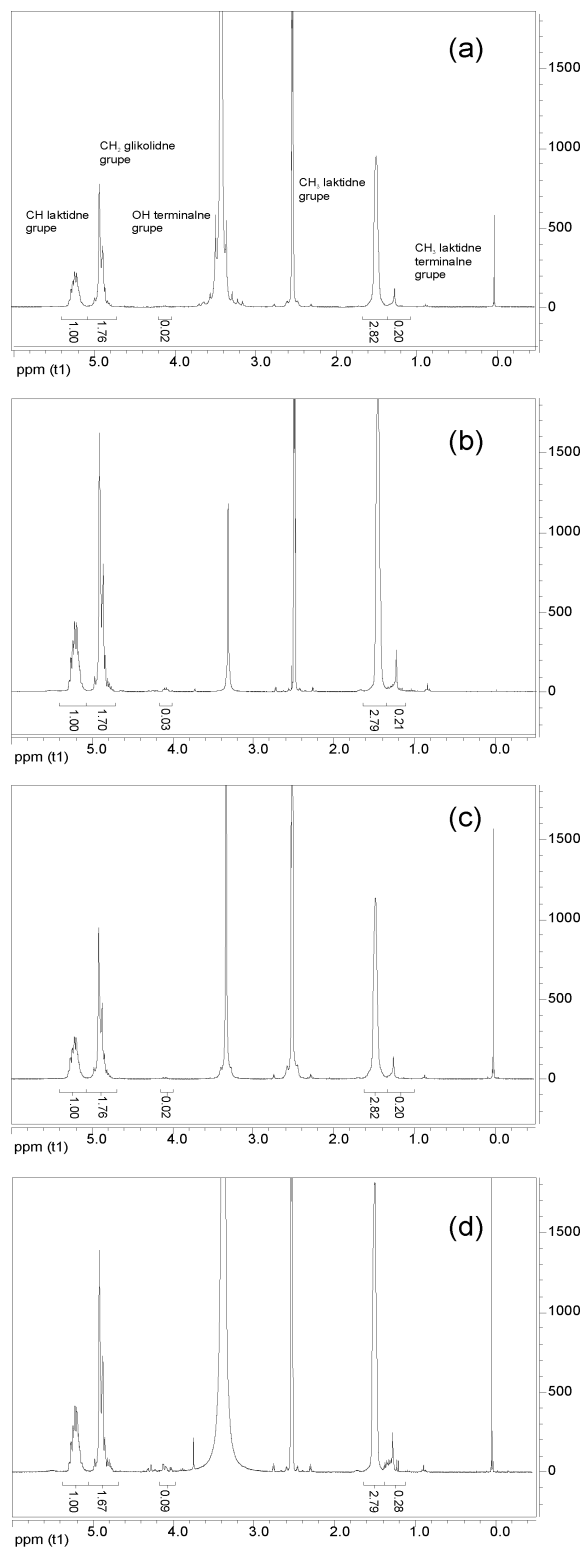
U poslednjem segmentu degradacijskog procesa koji je trajao između 21. i 30. dana inkubiranja materijala u fiziološkim uslovima morfološke karakteristike se značajno menjaju na taj način što se zapaža drastično povećanje veličina površinskih pora čiji dijametar dostiže veličinu i do 10  $\mu\text{m}$  dok se unutrašnje pore povećavaju do submikronskih dimenzija (slike 4.19a,b,c,d). Konačno po završetku celokupnog perioda u toku kog su praćeni degradacija polimernog dela kompozita i simultano otpuštanje leka, dolazi do potpunog rušenja poroznih planarnih struktura i formiranja izrazito poroznih filmova nepravilnog oblika (slika 4.19e,f).

#### 4.2.3. STRUKTURNE PROMENE PLGA/HAP KOMPOZITA U TOKU PROCESA DEGRADACIJE

---

Primećeno je da proces degradacije polimernog dela PLGA/HAP kompozita značajno zavisi od prisustva inkapsuliranog leka. Iz tog razloga promena strukture polimernog dela PLGA/HAP kompozita analizirana je zavisno od toga da li se dešavala samo degradacija polimera ili je taj proces bio praćen simultanim otpuštanjem leka.

Analiza strukture PLGA/HAP kompozita sa i bez inkapsuliranog klindamicina vršena je primenom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopije. Na slici 4.20 prikazani su  $^1\text{H}$  NMR spektri PLGA/HAP materijala bez inkapsuliranog leka pre (4.20a) i nakon (4.20b) procesa degradacije u kojima je ovaj proces tekao individualno, kao i spektri PLGA/HAP-a sa inkapsuliranim klindamicinom pre (4.20c) i nakon (4.20d) degradacije u kojima je zajedno sa degradacijom polimera tekao i proces otpuštanja leka. Na osnovu dobijenih spektara koji su odgovarali određenim periodima degradacije PLGA/HAP kompozita sa i bez klindamicina integracijom karakterističnih pikova dobijeni su podaci o udelu određenih grupa u polimeru (tabela 4.5). U skladu sa podacima dobijenim nakon integracije pikova laktidnih i glikolidnih ko-monomernih jedinica u polimeru, primećeno je da je promena odnosa laktidnih i glikolidnih (LA:GA) komonomernih jedinica u toku degradacije veoma mala. Ovaj podatak prvenstveno ukazuje na odsustvo preferentnog kidanja lanaca na mestu laktidnih odnosno glikolidnih jedinica i upućuje na postojanje slučajne degradacije lanaca veoma slično kao u slučaju degradacije koja je bila izazvana procesiranjem u polju ultrazvuka.<sup>[25]</sup>



**Slika 4.20.**  $^1\text{H}$  NMR spektri PLGA/HAp-a pre (a) i nakon (b) i PLGA/HAp/clindamicina pre (c) i nakon (d) procesa degradacije.

**Tabela 4.5: <sup>1</sup>H NMR rezultati dobijeni za analizu strukture PLGA/HAp kompozita sa i bez inkapsuliranog klindamicina u toku procesa degradacije.** <sup>[143]</sup>

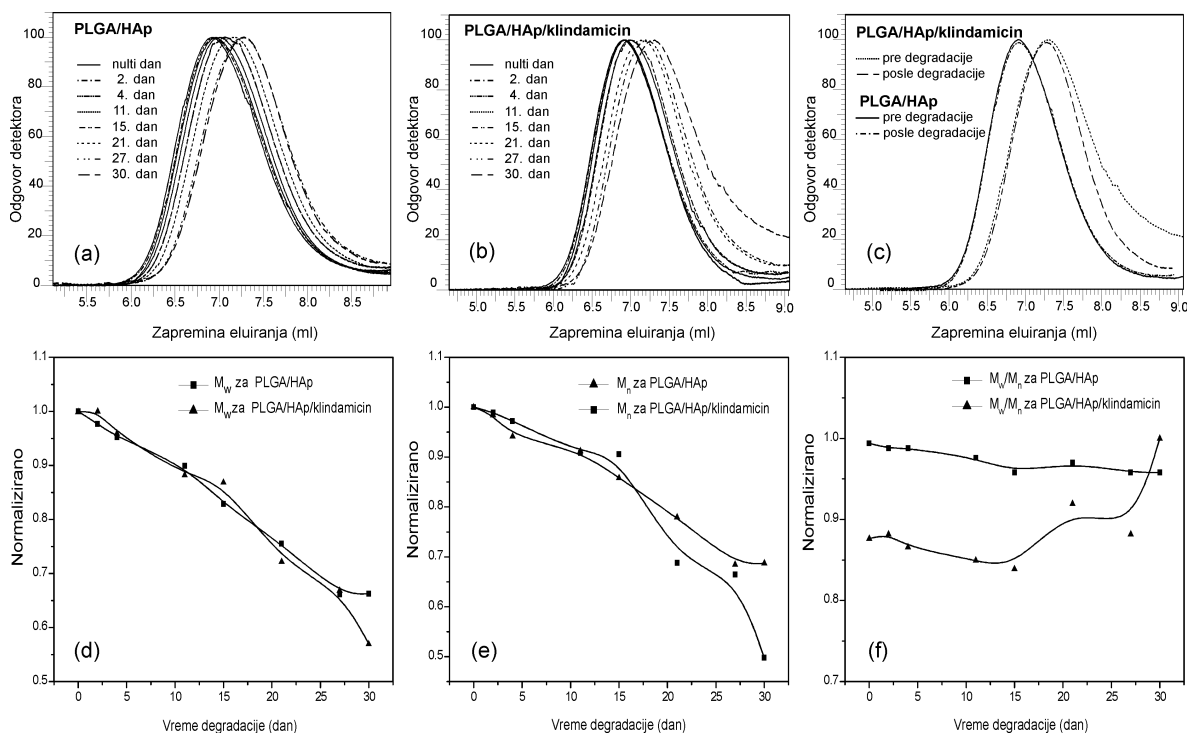
Uzorak	PLGA/HAp			PLGA/HAp/klindamicin			
	Degradacija (dan)	1	15	30	1	15	30
<b>CH<sub>1</sub>laktid</b>		1	1	1	1	1	1
<b>CH<sub>2</sub>glikolid</b>		1.76	1.75	1.70	1.76	1.73	1.67
<b>CH<sub>3</sub>laktid</b>		2.82	2.81	2.79	2.82	2.81	2.79
<b>LA:GA</b>		52:48	52:48	52:48	52:48	52:48	52:48
<b>CH<sub>3</sub> laktidne terminalne grupe</b>		0.20	0.20	0.21	0.20	0.19	0.28
<b>OH terminalne grupe</b>		0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.09

U slučaju kada su razmatrani udeli terminalnih –OH i –CH<sub>3</sub> grupa kompozita sa i bez inkapsuliranog klindamicina primećeno je da se udeo ovih grupa u slučaju prisustva klindamicina menja brže. Za razliku od kompozita bez leka čiji je polimerni deo u toku čitavog perioda od 30 dana degradacije pokazivao veoma malu promenu udela terminalnih grupa, udeo ovih grupa polimernog dela kompozita sa klindamicinom se do 15. dana degradacije menja veoma sporo nakon čega se do kraja 30. dana degradacije udeo ovih grupa povećava čak četiri puta u odnosu na početne vrednosti. Ovakvi rezultati upućuju na to da je u prisustvu leka koji se simultano otpušta sa odvijanjem procesa degradacije, brzina degradacionog procesa polimernog dela kompozita veća.

#### 4.2.4. PROMENE MOLARNIH MASA PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM U TOKU PROCESA DEGRADACIJE

U daljem toku analize promena koje nastaju prilikom degradacionog procesa polimernog dela PLGA/HAp kompozita sa i bez simultanog otpuštanja klindamicina analizirane su promene molarnih masa. Raspodele molarnih masa polimernog dela PLGA/HAp kompozita sa i bez klindamicina koje odgovaraju različitim periodima degradacije prikazane su na slikama

4.21 a i b. Poređenjem ovih raspodela uočava se pomeranje njihovih maksimuma ka većim zapreminama eluiranja sa vremenom degradacije što pokazuje progres ovog procesa. Sa stanovišta promene molarnih masa, zapaža se razlika u toku degradacije polimernog dela PLGA/HAp u zavisnosti od prisustva klindamicina, koja je veoma slična razlici koja je primećena na osnovu analize strukture. Nakon celokupnog perioda degradacije primećuje se povećanje polidisperznosti u slučaju degradacije polimernog dela kompozita sa klindamicinom koje ukazuje na veći udeo lanaca sa nižim molarnim masama, odnosno brži proces degradacije (slika 4.21 c).



**Slika 4.21.** Raspodele molarnih masa polimera u okviru PLGA/HAp (a) i PLGA/HAp/klindamicina (b) u toku procesa degradacije; komparativne krive raspodela molarnih masa polimera u PLGA/HAp-u bez i sa klindamicinom pre i nakon procesa degradacije (c); kriva promene  $M_w$  (d),  $M_n$  (e) i  $M_w/M_n$  (f) u toku procesa degradacije za PLGA/HAp sa (▲) i bez (■) klindamicina. <sup>[143]</sup>

Na slikama 4.21 d i e grafički su prikazane promene srednjih vrednosti molarnih masa ( $M_w$  i  $M_n$ ) polimera nastale degradacijom bez i u prisustvu kontrolisanog otpuštanja klindamicina u funkciji vremena. Moguće je zapaziti da u periodu od prvih 15 dana ove krive imaju veoma

sličan trend pokazujuću skoro jednaku promenu nezavisno od prisustva antibiotika (interval odgovara segmentima I i II krive otpuštanja leka na slici 4.14.a). Nakon ovog perioda nastaju značajnije razlike u zavisnosti od prisustva leka tako da se u toku treće nedelje zapaža manje odstupanje koje je zatim mnogo izraženije u toku poslednje, četvrte, nedelje analiziranog perioda (segmenti II i IV na slici 4.14a). Posledično, veoma sličan trend prati i promenu indeksa polidisperznosti ovih materijala. On se za polimerni deo PLGA/HAp-a sa vremenom degradacije menja veoma sporo, dok je njegova promena u slučaju polimernog dela ovog materijala sa klindamicinom do 15. dana degradacije spora nakon čega postaje izraženija što ukazuje na progresivniju hidrolizu i porast formiranja polimernih lanaca nižih molarnih masa (4.21 f).

U skladu sa prikazanim rezultatima koji se odnose na promenu molarnih masa polimernog dela kompozita sa vremenom degradacije jasno se zapaža veća brzina degradacije u slučaju kada se ovaj proces odvija simultano sa otpuštanjem leka što je u skladu sa rezultatima strukturne analize koja je urađena na osnovu NMR spektroskopije.

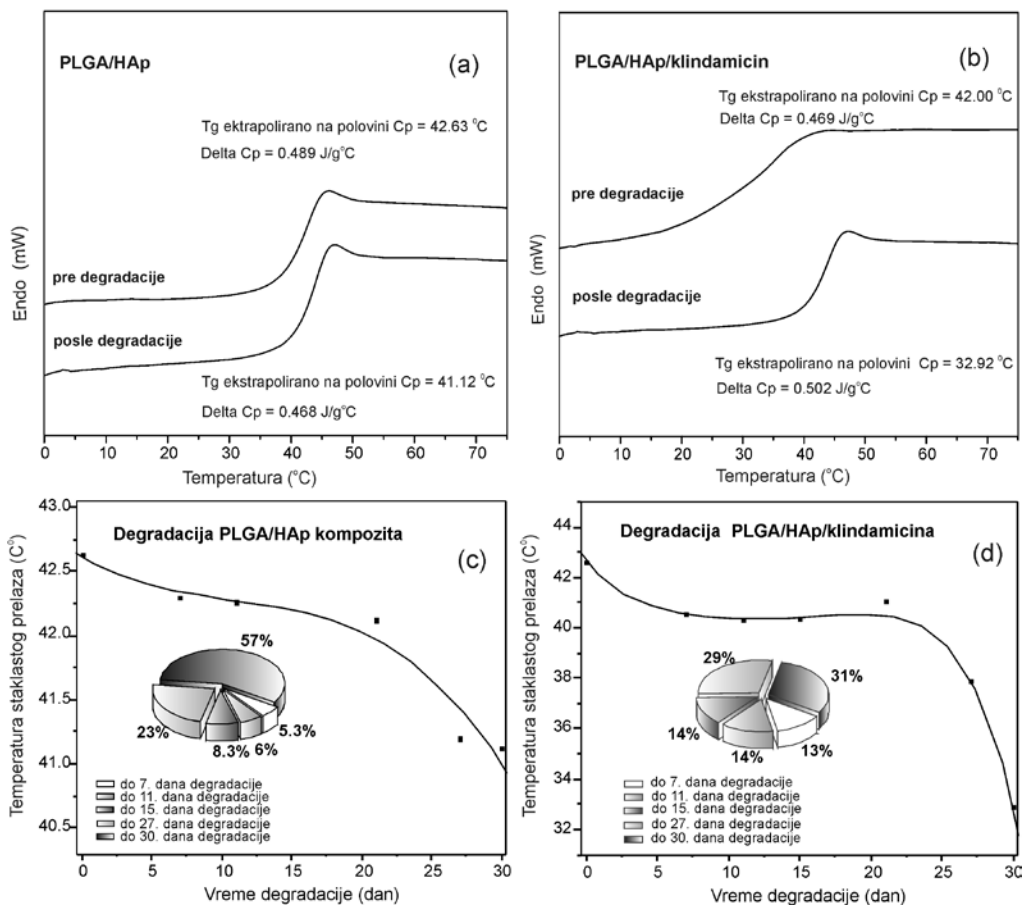
#### 4.2.5. TERMIČKE OSOBINE PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM U TOKU PROCESA DEGRADACIJE

---

Termičke karakteristike polimernog dela PLGA/HAp kompozita u toku procesa degradacije u zavisnosti od prisustva leka analizirane su na osnovu promene temperature staklastog prelaza. Ova temperatura, koja inače odgovara prelazu između čvrstog amorfno (staklastog) i viskoelastičnog stanja polimera, je indirektna indikacija fleksibilnosti i mobilnosti polimernih lanaca.

Slike 4.22 a i b prikazuju uporedne DSC grafike PLGA/HAp kompozitnog materijala sa i bez klindamicina koji su dobijeni merenjem materijala pre i nakon procesa degradacije. Pre degradacije PLGA/HAp i PLGA/HAp /klindamicin imaju veoma slične Tg vrednosti. Nakon perioda od 30 dana degradacije primećuju se značajne razlike ovih vrednosti u zavisnosti od prisustva antibiotika. Promene su takve da je veće smanjenje Tg vrednosti PLGA/HAp materijala dobijeno u slučaju inkapsuliranog klindamicina. Ovaj rezultat je indikacija veće mobilnosti polimernih lanaca u slučaju kada je tokom degradacije polimera prisutan lek što je potpuno u skladu sa rezultatima GPC analize molarnih masa koji pokazuju povećanje indeksa

polidisperznosti, odnosno prisustvo većeg sadržaja lanaca sa nižim vrednostima molarnih masa čija je pokretljivost posledično veća.



**Slika 4.22.** DSC grafici PLGA/HAp materijala bez (a) i sa (b) klindamicinom pre i nakon procesa degradacije; eksperimentalne (■) i fitovane (—) vrednosti temperature staklastog prelaza (Tg) polimera u PLGA/HAp (c) i PLGA/HAp/klindamicinu (d) u toku procesa degradacije sa odgovarajućim procentualnim udelima promene početne Tg vrednosti predstavljene u vidu insertovanih grafika. [143]

Postepena promena Tg vrednosti sa vremenom degradacije PLGA/HAp materijala sa i bez prisutnog klindamicina prikazane su na slikama 4.22 c i d. Insertovani grafici odnose se na udeo promene ove veličine u odnosu na početnu vrednost sa vremenom degradacije. U oba slučaja fitovanjem eksperimentalnih podataka postignuta je polinomska zavisnost trećeg reda. Međutim ukoliko se sa insertovanih grafika uporede udeli promena u odnosu na početnu Tg vrednost primećuju se značajne razlike u zavisnosti od prisustva klindamicina. To znači da se

u toku prve nedelje degradacije Tg vrednost polimernog dela kompozita sa lekom smanjuje za 13% u odnosu na početnu, dok je u slučaju materijala bez leka ta promena svega 5.3%. Kasniji interval degradacije pokazuju značajnije razlike u promeni Tg vrednosti zavisno od prisustva klindamicina. Ove razlike u brzini promene Tg vrednosti ukazuju na razlike u brzini strukturnih promena polimernog dela PLGA/HAp kompozita sa i bez klindamicina i u skladu su sa rezultatima NMR analize.

#### 4.2.6. POVRŠINSKE KARAKTERISTIKE PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM U TOKU PROCESA DEGRADACIJE

---

Materijali, naročito polimerni, mogu da promene svoja svojstva u zavisnosti od sredine u kojoj se nalaze. Obzirom na važnost površinskih karakteristika za primenu biomaterijala izuzetno je bitno analizirati njihovu eventualnu promenu tokom inkubacije u simuliranim fiziološkim uslovima. Na taj način se pruža mogućnost predikcije mogućih načina na koji bi ćelije sa materijalom reagovala.

Prilikom analize površinskih karakteristika PLGA/HAp kompozitnog materijala sa inkapsuliranim klindamicinom najpre je analizirana promena specifične površine u toku perioda degradacije i otpuštanja leka. Rezultati merenja specifičnih površina ovog materijala nakon određenih vremenskih intervala tokom kojih je bio inkubiran u simuliranim fiziološkim uslovima sumirani su u tabeli 4.6. Može se primetiti da specifična površina materijala tokom inkubiranja ne ostaje konstantna već da se menja u skladu sa degradacijom. Nakon prvih pet dana inkubacije vrednost specifične površine drastično opada u odnosu na početnu (tabela 4.4) što je u skladu sa promenom morfoloških karakteristika materijala koje su u ovom periodu degradacije pokazale intenzivnu agregaciju i srastanje sfernih čestica (slika 4.16). U toku druge nedelje progresivno opadanje specifične površine se nastavlja i njene vrednosti su toliko niske da nisu mogle biti izmerene. Ovakav odgovor vrlo jednostavno objašnjavaju zapažene promene morfoloških karakteristika koje u ovom periodu pokazuju formiranje kompaktnih planarnih struktura (slika 4.18). Sa druge strane u toku treće nedelje vrednosti specifičnih površina započinju značajan rast da bi do kraja 30. dana degradacije specifična površina dobila vrednost od čak 70.9 m<sup>2</sup>/g što je skoro osam puta veća vrednost u odnosu na specifičnu površinu polaznog materijala. Važno je naglasiti da je analizom morfoloških promena u ovom periodu primećeno formiranje filmova izražene poroznosti (slika 4.19).

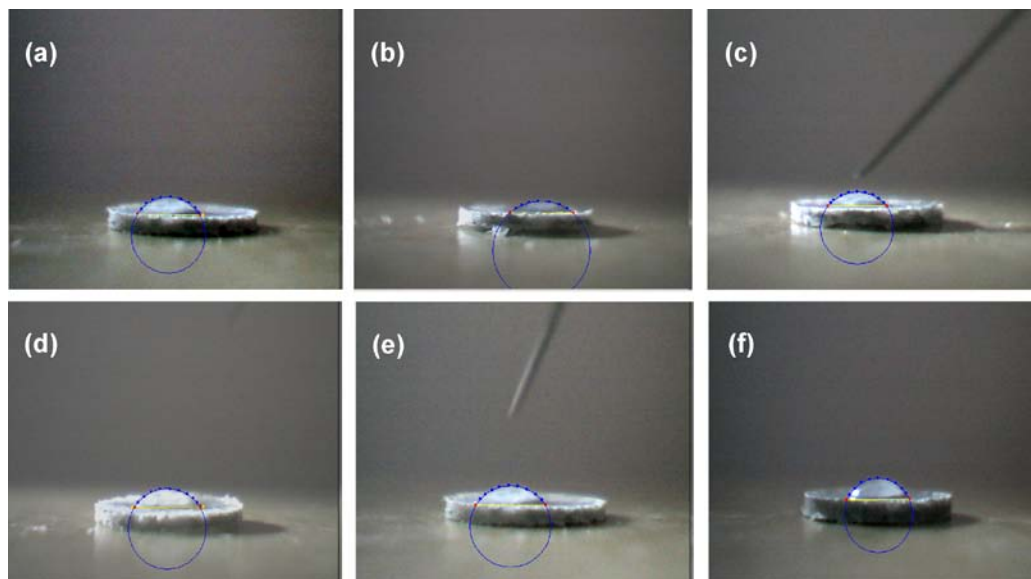


**Tabela 4.6: Rezultati određivanja specifičnih površina PLGA/HAp/klindamicina u toku procesa degradacije.**

PLGA/HAp/klindamicin 10%	Specifična površina (m <sup>2</sup> /g) <sup>3</sup>
5. dan degradacije	0.3
6. dan degradacije	Bez signala
13. dan degradacije	Bez signala
21. dan degradacije	26.6
30. dan degradacije	70.9

Kontaktni ugao materijala je takođe imao svojstvo da se postepeno menja u toku procesa degradacije i otpuštanja leka. Na slici 4.23 prikazane su fotografije pomoću kojih su merene vrednosti ugla kvašenja materijala dobijenih nakon određenih vremenskih intervala inkubiranja u vodenom rastvoru PBS-a, dok su srednje vrednosti izmerenih uglova sumirane u tabeli 4.7. Promene koje nastaju u toku prvih pet dana inkubacije materijala u PBS-u utiču na njegovu kvašljivost koja se značajno menja u odnosu na početni materijal što dovodi do poboljšanja hidrofilnosti njegove površine. Progresivan trend smanjenja kontaktnog ugla nastavlja se do devetog dana kada je i izmerena najniža vrednost od svega 40°. Nakon ovog perioda vrednost kontaktnog ugla počinje da raste ali do kraja analiziranog perioda degradacije ne prelazi vrednost od blizu 60° što je i dalje značajno niže od vrednosti koju je materijal imao pre početka degradacionog procesa. Ovim je pokazano da za razliku od početnog PLGA/HAp/klindamicina koji je bio na granici hidrofilnosti, nakon njegove inkubacije u simuliranim fiziološkim uslovima njegova hidrofilnost se značajno unapređuje što je posledica kako morfoloških tako i strukturnih promena koje prate materijal u toku degradacije i otpuštanja leka.

<sup>3</sup> Bez signala- vrednost specifične površine ispod granice detekcije uređaja.



**Slika 4.23.** Kvašenje PLGA/HAp/klindamicina nakon 5. (a), 9. (b), 13. (c), 18. (d), 24. (e) i 30. (f) dana degradacije.

**Tabela 4.7:** Uglovi kvašenja PLGA/HAp/klindamicina u toku procesa degradacije.

PLGA/HAp/klindamicin 10%	Ugao kvašenja (°)
5. dan degradacije	56
9. dan degradacije	40
13. dan degradacije	52
18. dan degradacije	57
24. dan degradacije	58
30. dan degradacije	64

Površinsko naelektrisanje, mereno na osnovu mobilnosti čestica, analizirano je za materijale koji su u toku prvih pet dana inkubirani u simuliranim fiziološkim uslovima, obzirom na to da se sferne čestice koje karakteriše određeni stepen aglomeracije zapažaju samo u tom periodu, dok se kasnije formiraju kompaktne planarne strukture. Razmatranjem promena vrednosti površinskog naelektrisanja čestica koje su prikazane u tabeli 4.8 zapaža se da se njegova vrednost menja u skladu sa do sada analiziranim osobinama površine ovog

materijala. U poređenju sa naelektrisanjem površine materijala merenim pre početka degradacije (tabela 4.4) zapaža se nagli porast apsolutne vrednosti površinskog naelektrisanja neposredno nakon početka inkubacije u fosfatnom puferu koje zatim pokazuje postepeni pad usled početka agregacije čestica, njihovog uzajamnog srastanja i građenja većih struktura.

**Tabela 4.8: Površinsko naelektrisanje čestica PLGA/HAp/klindamicina u toku procesa degradacije.**

PLGA/HAp/klindamicin 10%	z-potential (eV)
1. dan degradacije	-43
2. dan degradacije	-58
3. dan degradacije	-52
4. dan degradacije	-45
5. dan degradacije	-32
6. dan degradacije	/ <sup>4</sup>

### **4.3. IN VITRO CITOTOKSIČNOST PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM**

Nakon sinteze, karakterizacije i dizajniranja materijala čija je dalja namena biomedicinska aplikacija u vidu novog leka ili uređaja za aplikaciju biomedicinski aktivnih supstanci, jedan od izuzetno važnih koraka u procesu razvoja je analiza biokompatibilnosti. Ovaj korak zahteva prilično složenu proceduru koja započinje sa analizom uticaja materijala na ćelije u *in vitro* uslovima, odnosno ispitivanjem citotoksičnosti.

U toku analize citotoksičnosti PLGA/HAp materijala sa inkapsuliranim klindamicinom najpre su korišćena tri standardna testa koji se odnose na kompaktnost ćelijske membrane, metaboličku aktivnost i prisustva kiselih regiona kao što su proliferativna DNK i lipozomi koji se rutinski primenjuju za ovu vrstu analize kako bi se dobila kvantitativna mera toksičnosti.

<sup>4</sup> Formiranje nedisperzivnih agregata.

Dodatno su analizirane i morfološke karakteristike ćelija nakon kontakta sa materijalom kao i njihova mogućnost adhezije, rasta i širenja na površini materijala.

#### 4.3.1. KVANTIFIKACIJA STEPENA CITOTOKSIČNOSTI PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM

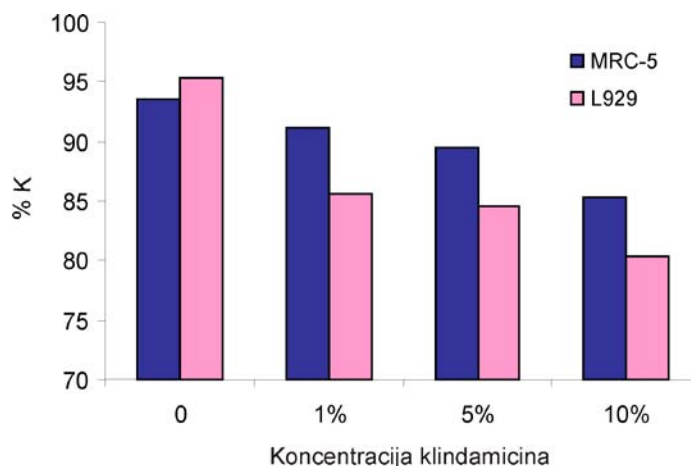
---

Kvantifikacija stepena citotoksičnosti materijala vršena je na dvema ćelijskim linijama, L929 fibroblastima iz miša i MRC-5 humanim fibroblastima iz pluća. Analizirana je toksičnost PLGA/HAp kompozitnog materijala sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina uz primenu kompozita bez antibiotika kao kontrolnog materijala. Za tu namenu primenjeni su MTT, DET i difuzni agar test.

Na slici 4.24 grafički je predstavljeno preživljavanja ćelija dobijenih nakon inkubacije u prisustvu PLGA/HAp materijala sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina (1%, 5% i 10%) kao i čistog PLGA/HAp-a bez leka dobijeno na osnovu DET testa. Grafik predstavlja uporedne rezultate DET testa na MRC-5 i L929 ćelijama. Razmatrani su uticaji samog prisustva kao i povećanje koncentracije inkapsuliranog leka na postignuti stepen toksičnosti. Na osnovu procenata preživljavanja ćelija najveći stepen citokompatibilnosti dobijen je za PLGA/HAp kompozitni materijal bez inkapsuliranog leka. Sa povećanjem udela klindamicina u materijalu postignuto je smanjenje udela preživelih ćelija tako da rezultati ukazuju na koncentracijski zavisnu toksičnost leka. Dalja razmatranja su se odnosila na poređenje postignutih rezultata u zavisnosti od primenjene vrste ćelija. Zapaža se da je u slučaju PLGA/HAp kompozita bez prisustva leka za obe analizirane ćelijske linije postignuta slična vrednost udela stepena preživljavanja. Za razliku od toga u svim ostalim slučajevima kada je klindamicin bio inkapsuliran u različitim koncentracijama postignut je veći stepen preživljavanja MRC-5 humanih fibroblasta u odnosu na L929 fibroblasta iz miša.

Ukoliko se razmotre vrednosti procentualnih udela preživljavanja za obe vrste ćelija i različite koncentracije inkapsuliranog leka istovremeno, može se primetiti da je najveći stepen preživljavanja postignut za L929 fibroblaste miša i iznosi  $95.4 \pm 2.9$ , dok je najniži postignut za istu vrstu ćelija inkubiranih u prisustvu PLGA/HAp materijala sa 10 % inkapsuliranog klindamicina i iznosi  $80.3 \pm 1.9$  % (tabela 4.9). Kako se toksičnim materijalom koji je analiziran ovom metodom smatra onaj za koji je postignuta maksimalna vrednost

preživljavanja do 50%, dobijeni interval procentualnih udela preživljavanja analiziranih materijala ukazuje na njihov izuzetno visok stepen citokompatibilnosti.



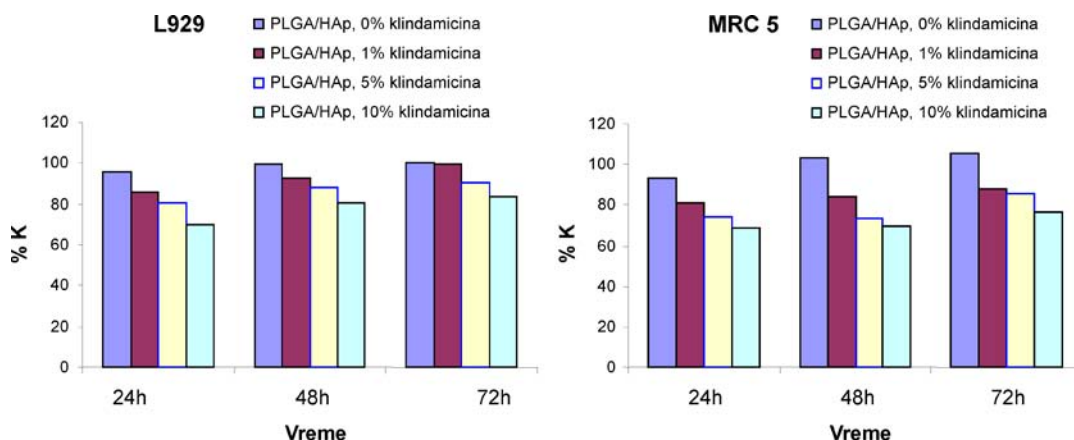
**Slika 4.24.** Rezultati DET testa citotoksičnosti PLGA/HAp kompozita sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina dobijeni na MRC-5 i L929 ćelijskim linijama nakon inkubacije u toku 24h.

**Tabela 4.9:** Srednje vrednosti i standardne devijacije udela preživljavanja MRC-5 i L929 ćelija određene DET metodom nakon inkubacije u toku 24h.

Uzorak	Udeo preživljavanja (%)	
	MRC-5	L929
PLGA/HAp	93.6 ± 2.3	95.4 ± 2.9
PLGA/HAp/klindamicin 1%	91.2 ± 5.0	85.7 ± 3.3
PLGA/HAp/klindamicin 5%	89.6 ± 2.8	84.6 ± 3.3
PLGA/HAp/klindamicin 10%	85.3 ± 2.4	80.3 ± 1.9

Druga metoda kojom je analiziran stepen citotoksičnosti PLGA/HAp kompozita sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina bila je MTT metoda zasnovana na merenju metaboličke aktivnosti ćelija odnosno njihovoj sposobnosti da redukuju tetrazolijumsku so koja je primenjena za ćelijsko bojenje. Analiza je urađena na L929 i MRC-5 ćelijskim linijama i citotoksičnost je praćena u zavisnosti od vremena inkubiranja u prisustvu materijala. Intervali

inkubiranja nakon kojih su vršena meranja bili su 24h, 48h i 72h. Dobijene vrednosti procentualnog udela preživljavanja u funkciji vremena inkubiranja u prisustvu materijala prikazane su grafički na slici 4.25. Jednako kao i kod DET testa, rezultati MTT analize najpre pokazuju koncentracijsku zavisnost koja je zapažena pri svim vremenima inkubiranja obe vrste ćelija. Drugim rečima dobijene vrednosti procentualnih udela preživelih ćelija opadaju sa porastom koncentracije inkapsuliranog leka, dok su najviše vrednosti stepena preživljavanja postignute za kompozit bez klindamicina. Dodatno je primećeno da vreme inkubiranja nema značajnog udela u procentu preživljavanja ćelija, odnosno da u slučaju obe vrste analiziranih ćelija sa vremenom ne dolazi do značajne promene toksičnosti. U skladu sa tim pojava vremenski zavisne toksičnosti je isključena. Razmatranjem maksimalne i minimalne vrednosti stepena preživljavanja (tabela 4.10), pokazuje da je postignut visok stepen citokompatibilnosti što je u skladu sa rezultatima DET testa.



**Slika 4.25.** Rezultati MTT testa citotoksičnosti PLGA/HAp kompozita sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina dobijeni na MRC-5 i L929 ćelijskim linijama nakon inkubacije u toku različitih vremenskih intervala.

Treći test analize citotoksičnosti PLGA/HAp materijala sa inkapsuliranim klindamicinom u koncentracijama od 0%, 1%, 5% i 10% koji je urađen na L929 i MRC-5 fibroblastima bila je agarna difuzija. Nakon inkubacije ćelija sa ovim materijalima u periodu od 24h, nije dobijena zona obezbojavanja ni oko materijala niti ispod njega. Primećeno je takođe da nije bilo tragova lize ćelija u blizini kao ni ispod materijala. U skladu sa indeksiranjem parametara i

definisanjem nivoa citotoksičnosti u difuznom agar testu po Schmalz-u [242] (tabela 3.2) postignute vrednosti zonskog indeksa i indeksa lize su nula. Na osnovu postignutih vrednosti dobijeno je da je indeks odgovora 0/0 što analizirane materijale svrstava u prvu grupu klasifikacije toksičnosti materijala po Schmalz-u koja ima vrednost indeksa odgovora u opsegu između 0/0 i 0.5/0.5 koja je predstavljena kao grupa bez toksičnog odgovora (tabela 3.2).

**Tabela 4.10: Srednje vrednosti i standardne devijacije udela preživljavanja MRC-5 i L929 ćelija određene MTT metodom nakon inkubacije u toku 24h.**

Uzorak	Udeo preživljavanja (%)	
	MRC-5	L929
<b>PLGA/HAp</b>	92.9 ± 1.2	95.7 ± 1.5
<b>PLGA/HAp/klindamicin 1%</b>	80.9 ± 0.3	85.7 ± 3.6
<b>PLGA/HAp/klindamicin 5%</b>	74.1 ± 2.9	80.7 ± 1.7
<b>PLGA/HAp/klindamicin 10%</b>	68.8 ± 1.4	70.2 ± 2.1

#### 4.3.2. MORFOLOŠKA ANALIZA ĆELIJA INKUBIRANIH U PRISUSTVU PLGA/HAP KOMPOZITA SA RAZLIČITIM SADRŽAJEM KLINDAMICINA

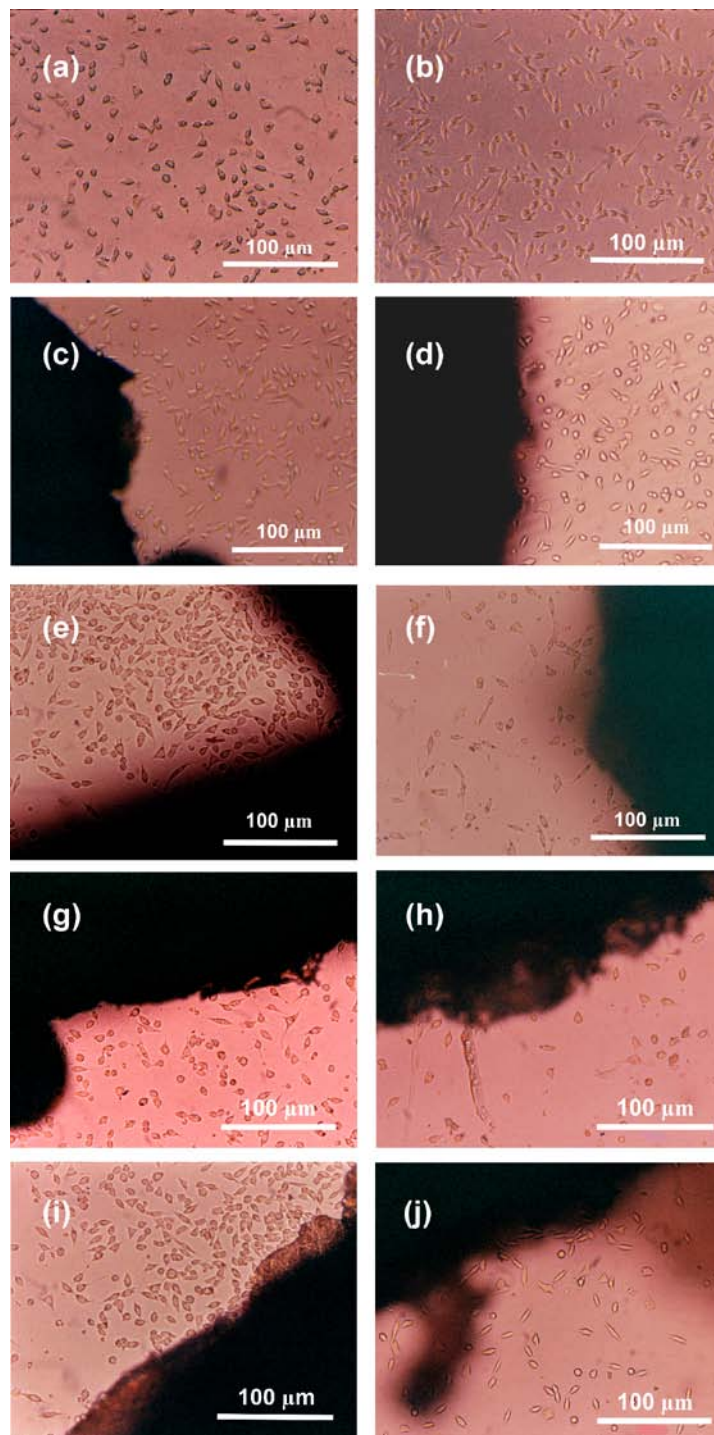
Nakon kvantifikacije stepena citotoksičnosti PLGA/HAP materijala sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina koji je pokazao visok stepen citokompatibilnosti za obe vrste analiziranih ćelija u daljoj analizi reakcija ćelija na prisustvo testiranih materijala praćene su njihove morfološke promene. Promena morfologije ćelija u prisustvu materijala čija se toksičnost analizira može da pruži korisne informacije vezane za tendenciju toksičnosti materijala i tok dalje interakcije između njega i živih ćelija.

Mikrografije PLGA/HAP kompozita za sve četiri analizirane koncentracije inkapsuliranog klindamicina nakon inkubacije sa ćelijama u toku 24h prikazane su na slici 4.26. Kao kontrola korišćene su mikrografije MRC-5 i L929 koje su inkubirane pod jednakim uslovima bez prisustva PLGA/HAP materijala (slike 4.26a,b). Dodatna kontrola koja se odnosila na analizu interakcija samog PLGA/HAP kompozitnog materijala bez inkapsuliranog klindamicina sa ćelijama urađena je na osnovu mikrografija prikazanim na slikama 4.26c,d. L929 i MRC-5

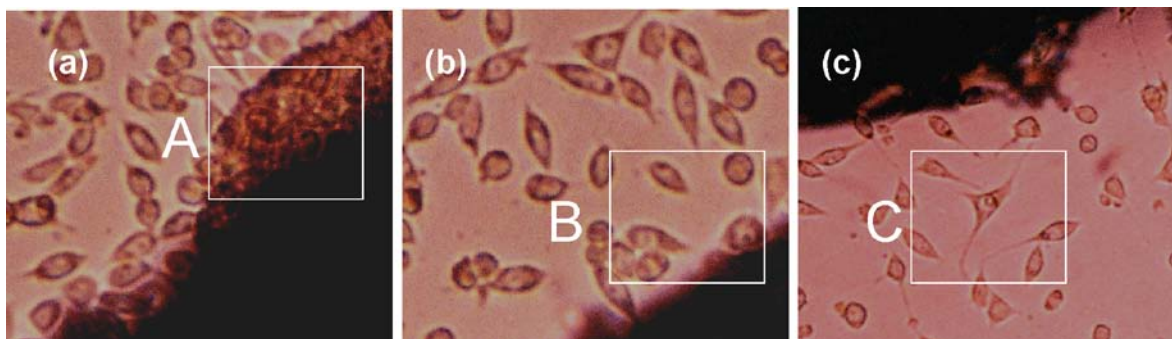
ćelije inkubirane u prisustvu PLGA/HAp kompozita sa 1% inkapsuliranog klindamicina prikazane su na slikama 4.26 e i f, iste ćelije inkubirane u prisustvu kompozita sa 5% klindamicina prikazane su na slikama 4.26 g i h, dok su na slikama 4.26 i i j prikazane ćelije inkubirane sa materijalom sa najvećim sadržajem inkapsuliranog klindamicina od 10%. Na ovim mikrografijama tamna polja odgovaraju PLGA/HAp kompozitnom materijalu, dok svetla odgovaraju ćelijama u hranljivom medijumu što znači da je analiza morfologije i interakcije ćelija i materijala rađena na ivici materijala.

Ukoliko se razmotri prisustvo ćelija u blizini ivice materijala zapaža se da ni u jednom slučaju nije zapažena zona inhibicije i da su u svim slučajevima one bile prisutne u blizini materijala. Pored prisustva ćelija blizu površine materijala dodatno se primećuje i to da su neke od njih bile u mogućnosti da uspostave kontakt sa materijalom što je najlakše zapaziti na slici 4.26 e. Više detalja u vezi morfoloških karakteristika fibroblastnih ćelija u oblasti blizu površine PLGA/HAp materijala sa klindamicinom zapaža se na slici 4.27. Vidljivo je da su ćelije bile u mogućnosti da se povežu sa površinom materijala uspostavljajući kontakt sa njom (slika 29 a) što se u nekim regionima odnosilo samo na pojedinačne ćelije dok su u nekim regionima primećene velike kohezivne grupe ćelija koje su formirane na njegovoj površini (segment A na slici 4.27a). U blizini površine materijala ćelije su u glavnom bile izduženog (vretenastog), zvezdastog ili multipolarnog (zrakastog) oblika <sup>[250]</sup> sa primetnim jedrom i jedarcetom pravilnog ovalnog oblika koji su karakteristični za vijabilne fibroblastne ćelije (slika 4.27b). U pojedinim oblastima primećeno je prisustvo ćelija okruglog oblika i pretpostavlja se da ove ćelije odgovaraju ćelijama na putu ka degeneraciji (segment B na slici 4.27b). Sa druge strane primećeno je da su pojedine ćelije formirale citoplazmatične nastavke i retikularna vlakna koji im omogućavaju uspostavljanje fokalnog kontakta sa materijalom (segment C na slici 4.27c).





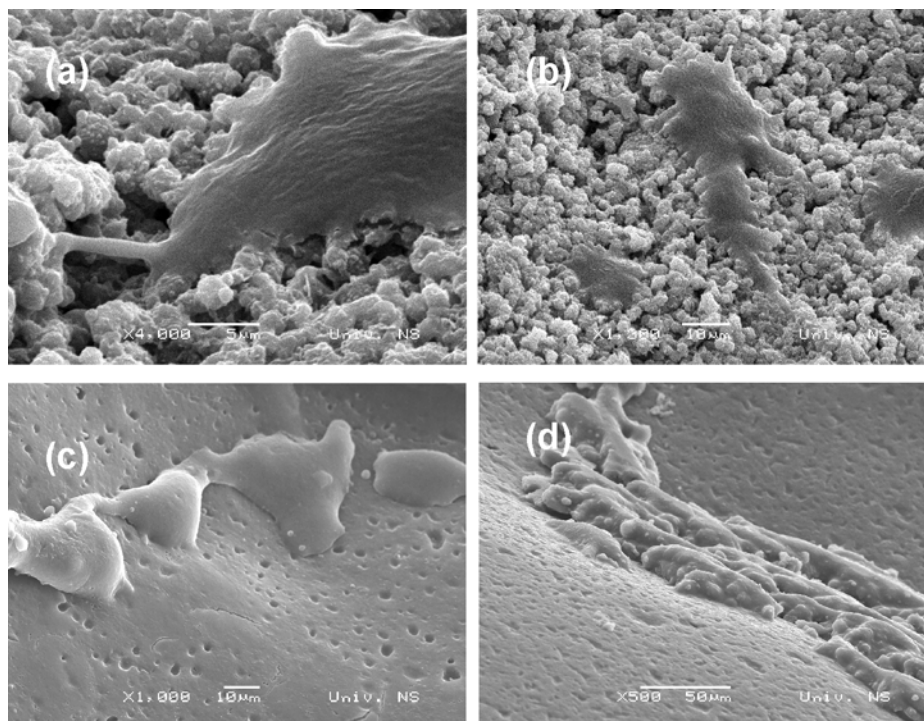
**Slika 4.26.** Optičke mikrografije L929 i MRC-5 kontrolnih ćelija (a,b) i istih ćelija na površini PLGA/HAp kompozita sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina: 0% (c,d), 1% (e,f), 5% (g,h) i 10% (i,j).



**Slika 4.27.** Morfologija ćelija u blizini površine PLGA/HAp/klindamicina.

#### 4.3.3. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE ĆELIJA ADHERIRANIH ZA POVRŠINU PLGA/HAP KOMPOZITA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM

Nakon analize morfologije ćelija i njihovog kontakta sa ivicom PLGA/HAp materijala sa klindamicinom detaljnije je analizirana sposobnost njihove adhezije, širenja i ćelijskog rasta na površini materijala. Za tu namenu primenjena je metoda skanirajuće mikroskopije.



**Slika 4.28.** SEM mikrografije MRC-5 (a,b) i L929 (c,d) ćelija vezanih za površinu PLGA/HAp/klindamicina.

Adhezija MRC-5 humanih fibroblasta na površini materijala sa lekom zapaža se na slikama 4.28 a i b. Čelije su zrakastog oblika i pokazuju uspostavljanje veoma bliskog kontakta sa površinom materijala kao i vezivanje za površinu preko formiranih citoplazmatičnih nastavaka (slika 4.28a). Kontakt između površine kompozita sa klindamicinom i L929 fibroblasta moguće je primetiti na slikama 4.28c i d. Ove ćelije su trouglastog oblika i imaju svojstvo da se međusobno vezuju gradeći manje ili veće grupe adherirane za površinu materijala. Sposobnost ćelija da uspostave ovakav tip adhezije sa materijalom potvrđuje visok stepen njegove citokompatibilnosti i ukazuje na mogućnost njegove veoma dobre bioaktivnosti i sposobnosti da inicira ćelijsku diferencijaciju.

# DISKUSIJA

---

**V**

## **5.1. INKAPSULACIJA KLINDAMICINA U PLGA/HAP KOMPOZITNI MATERIJAL PRIMENOM METODE ULTRAZVUČNOG PROCESIRANJA I KARAKTERISTIKE MATERIJALA**

---

### **5.1.1. PRINCIP INKAPSULACIJE KLINDAMICINA U OKVIRU PLGA/HAP BIOKOMPOZITA**

---

Metoda ultrazvučnog procesiranja optimizovana je za inkapsulaciju klindamicina u okviru PLGA/HAp kompozitnih čestica sa udelom polimerne i biokeramičke komponente 90:10 mas.%. U toku optimizacije uslova za formiranje multifunkcionalnog materijala u formi strukture „omotač-jezgro“ sa inkapsuliranim lekom ispitan je uticaj različitih rastvarača i nerastvarača polimera kako na morfološke osobine formiranih čestica tako i na sam proces inkapsulacije. Primenjena metoda inkapsulacije se u odnosu na rastvarače može podeliti u dve grupe: (i) organski rastvarač i organski nerastvarač polimera i (ii) organski rastvarač polimera i voda kao njegov nerastvarač.

Pokazano je da rastvorljivost svake od komponenata ovog materijala, polimerne i inkapsulirane, ima izuzetno značajan uticaj na osobine finalnog produkta u toku procesiranja. Najvažniji uticaj rastvorljivosti ovih komponenata u izabranom rastvaraču i nerastvaraču odnosi se na dve njegove veoma važne osobine: stepen inkapsulacije i uniformnost veličine i oblika dobijenih struktura.

Sa stanovišta veličine čestica rezultujućih struktura utvrđeno je da se sa povećanjem rastvorljivosti polimera i klindamicina u izabranom rastvaraču polimera kao i povećanjem rastvorljivosti klindamicina u nerastvaraču polimera značajno smanjuje veličina dobijenih čestica. Povećanje rastvorljivosti PLGA i klindamicina postiže se primenom acetonitrila kao rastvarača polimera, dok se povećanje rastvorljivosti klindamicina u nerastvaraču polimera postiže zamenom organskog taložnog sredstva polimera vodom. Na ovaj način postiže se smanjenje veličine čestica PLGA/HAp/klindamicina od nekoliko desetina mikrometara do submikronskih sfera koje odlikuje nanostrukturiranost.

Ovakav uticaj rastvorljivosti polimera i leka koji se inkapsulira na morfologiju rezultujućih čestica moguće je objasniti preko samog procesa precipitacije. Ukoliko se krene od precipitacije polimera, ovaj proces se dešava kao posledica zamene molekula rastvarača

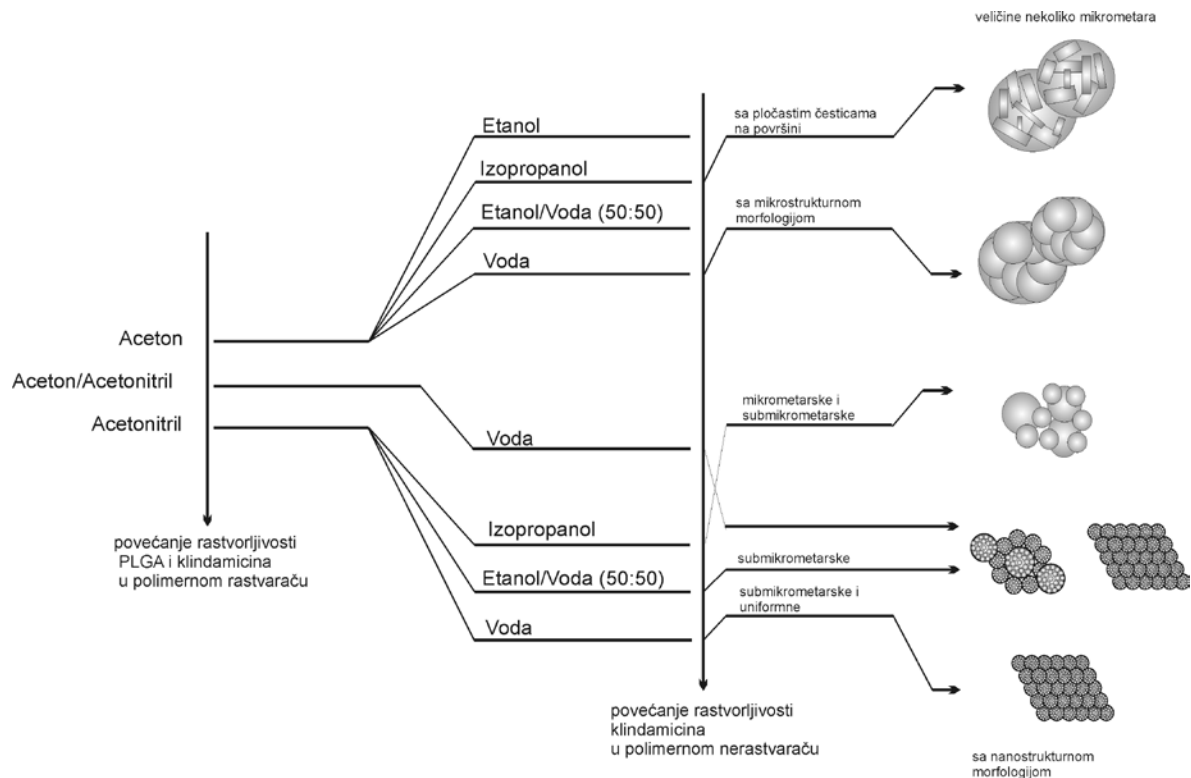
polimera molekulima polimernog nerastvarača. U momentu kada je u okolini polimera postignuta kritična koncentracija molekula nerastvarača njegova rastvorljivost se smanjuje i počinje njegovo taloženje. U slučaju dobre rastvorljivosti polimera u izabranom rastvaraču polimera teže je inicirati zamenu molekula njegovog rastvarača molekulima nerastvarača čak i kada je nerastvarač dodat u duplo većoj zapremini u odnosu na rastvarač. Veoma jednostavan primer za to je značajno duže vreme centrifugiranja koje je neophodno kako bi se postiglo potpuno taloženje PLGA i bistar supernatant iznad taloga u slučaju kada je kao nerastvarač primenjen acetonitril u poređenju sa primenom acetona. Iz tog razloga je u slučaju primene dobrog rastvarača polimera njegova precipitacija spor proces i formirane primarne čestice su nanometarskih dimenzija. Ako se razmotri dinamično okruženje koje postoji u slučaju ultrazvučnog procesiranja, odnosno intenzivno mešanje i homogenizacija, postepeno formiranje ovih čestica smanjuje verovatnoću njihovih intenzivnih sudara u toku ultrazvučnog dispergovanja. Ove primarno formirane čestice imaju tendenciju da agregiraju u cilju smanjenja površinske energije i da grade submikronske sfere (slika 4.1 u poglavlju 4.1.1. Optimizacija procesa inkapsulacije klindamicina u okviru PLGA/HAp-a). Ne dolazi do njihovog potpunog srastanja u veće čestice tako da i dalje egzistiraju kao jedinice koje grade nanostrukturiranost submikronskih sfera. Postignuta morfološka pravilnost i uniformnost rezultujućih čestica može se povezati sa homogenošću koja se javlja u toku ovog sporog procesa precipitacije. Nasuprot toga, u slučaju kada je primenjen slabiji polimerni rastvarač (acetone u ovom primeru), sa dodatkom nerastvarača polimera njegova precipitacija se dešava značajno brže. U tom slučaju primarno formirane čestice su veće kao i njihova koncentracija u jedinici zapremine što je u dinamičnoj sredini koja se postiže tokom ultrazvučnog procesiranja veoma pogodno za intenzivne sudare. Iz tog razloga kao rezultat dolazi do formiranja značajno većih sekundarnih čestica nepravilnog sfernog oblika koje su agregati primarnih. Usled intenzivnih sudara ove čestice imaju tendenciju daljeg rasta što vodi do formiranja finalnih čestica mikronskih dimenzija (slika 4.1 u poglavlju 4.1.1. Optimizacija procesa inkapsulacije klindamicina u okviru PLGA/HAp-a ).

Rastvorljivost komponenti PLGA/HAp/klindamicina u izabranoj kombinaciji rastvarača i nerastvarača (organski/organski ili organski/vodeni) uticala je i na proces inkapsulacije. Pokazano je da se sa povećanjem rastvorljivosti klindamicina u kombinaciji rastvarača i nerastvarača polimera postiže smanjenje dimenzija njegovih čestica koje su vezane za

površinu PLGA/HAp sfera. U slučaju primene acetonitrila i vode kao sistema rastvarač/nerastvarač polimera u kome je klindamicin imao najbolju rastvorljivost postignuta je potpuna inkapsulacija klindamicina u okviru kompozitnih sfera bez formiranja dodatnih čestica vezanih za površinu.

Uticao rastvorljivosti klindamicina na proces inkapsulacije u okviru PLGA/HAp čestica moguće je objasniti preko prisustva odnosno odsustva njegove koprecipitacije zajedno sa precipitacijom polimera. U slučaju slabe rastvorljivosti polimera u izabranom rastvaraču proces njegove precipitacije je brz (sistem organski/organski rastvarač/nerastvarač). Obzirom na to da je i klindamicin imao slabu rastvorljivost u izabranom rastvaraču/nerastvaraču polimera, drastično povećanje viskoznosti sredine koje nastaje u toku brze precipitacije polimera rezultuje simultanu precipitaciju klindamicina sa polimerom. Iz tog razloga jedan deo klindamicina zaostaje izvan kompozitnih sfernih čestica i biva vezan za njihovu površinu. Potpuno suprotna situacija je primećena u slučaju kada je rastvorljivost polimera bila visoka a njegova precipitacija spor proces (sistem organski/vodeni rastvarač/nerastvarač). Uzimajući u obzir da je rastvorljivost klindamicina u ovim rastvaračima bila dobra, postepena promena viskoznosti sredine izazvana precipitacijom polimera nije izazvala istovremenu precipitaciju klindamicina. Obzirom na to da klindamicin ostaje u rastvoru, njegova inkapsulacija se postiže fizičkim zadržavanjem rastvora unutar „jezgro-omotač“ PLGA/HAp struktura u toku njihovog formiranja. U tom slučaju postignuta je potpuna inkapsulacija i formirane su PLGA/HAp sferne čestice sa inkapsuliranim klindamicinom.

Opisani uticaj različitih rastvarača odnosno nerastvarača na morfološke karakteristike i inkapsulaciju finalnih čestica PLGA/HAp/klindamicina u zavisnosti od rastvorljivost klindamicina i polimera shematski je sumiran na slici 5.1. Značaj istaknute korelacije je naročito vezan za primenu opisane metode za inkapsulaciju odnosno imobilizaciju bilo koje druge u vodi rastvorne supstance u okviru PLGA/HAp multifunkcionalnog materijala primenjenog kao nosača.



**Slika 5.1.** Shematski prikaz uticaja rastvorljivosti klindamicina i PLGA u sistemu rastvarač/nerastvarač na morfološke karakteristike i inkapsulaciju klindamicina u okviru PLGA/HAP-a.

### 5.1.2. „JEZGRO-OMOTAČ“ STRUKTURA PLGA/HAP-A SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM

Kao što je već istaknuto najpravilnija morfologija PLGA/HAp čestica sa „jezgro-omotač“ strukturom u okviru koje je inkapsuliran klindamicin i za koju je postignuto značajno smanjenje dimenzija dobijena je primenom acetonitrila i vode kao sistema rastvarač/nerastvarač polimera. Na slici 5.2 shematski je prikazan predložen mehanizam za formiranje ovih „jezgro-omotač“ struktura i inkapsulaciju klindamicina u slučaju njegove najbolje rastvorljivosti u izabranom rastvaraču odnosno nerastvaraču.





**Slika 5.2.** Predloženi mehanizam formiranja PLGA/HAp/klindamicin nanostrukturnih čestica sa „jezgro-omotač“ strukturom.

U toku procesa inkapsulacije klindamicina u okviru PLGA/HAp čestica, primećeno je da on ima dodatnu funkciju u kontrolisanju morfoloških parametara kompozitnih čestica nosača leka (slika 4.7 u poglavlju Rezultati). Uticaj klindamicina kao stabilizatora morfologije ispoljava se kroz kontrolisanje raspodele veličine i oblika rezultujućih „jezgro-omotač“ struktura. Ovaj zaključak je donet na osnovu činjenice da se sa povećanjem koncentracije inkapsuliranog leka postižu uže raspodele morfoloških parametara PLGA/HAp čestica kao i njihova uniformnija morfologija. Veće koncentracije klindamicina omogućavale su formiranje pravilnijih struktura sa znatno užom raspodelom dijametara čestica čija je srednja vrednost bila 160 nm. Sličan uticaj inkapsulacije različitih koncentracija inkapsuliranog leka na morfološke karakteristike čestica nosača primećen je u slučaju inkapsulacije paksitacela u okviru poli(etilen-glikol)-blok-poli(L-laktid) (PEG-b-PDLA) čestica sa „jezgro-omotač“ strukturom. Ovaj uticaj je objašnjen kao posledica promene supramolekulske strukture PEG-b-PDLA prilikom formiranja PEG-b-PDLA/paklitaksela.<sup>[32]</sup> U ovom slučaju uloga inkapsuliranog klindamicina kao regulatora morfologije PLGA/HAp čestica može biti objašnjena najpre preko elektrostatičkih interakcija koje se mogu javiti kao posledica prisustva polarnih grupa u okviru molekula klindamicina kao i preko sternih interakcija koje postoje usled njegove razgranate strukture. Ovakve osobine molekula klindamicina čine ovu supstancu veoma efikasnim stabilizatorom morfologije.

Pokazano je da se optimizacijom metode ultrazvučnog procesiranja dolazi do vrlo efikasne metode za inkapsulaciju aktivnih supstanci u okviru submikronskih nosača. U ovom slučaju nakon optimizacije parametara i formiranja PLGA/HAp/klindamicina, lek nije detektovan na površini čestica već u okviru unutrašnje strane polimernog omotača kao i na površini biokeramičkog jezgra. Polimerni omotač u okviru koga je lek dispergovan odlikuje nanostrukturiranost i grade ga manje primarne sferne čestica veličine oko 20 nm. Nanostrukturirani materijali imaju značajan doprinos u razvoju kontrolisane dostave lekova koji se zasniva na mogućnošću precizne kontrole brzine i perioda dostave do ciljanog mesta.<sup>[42]</sup> To je jedan od razloga zbog kog se danas mnoge metode razvijaju u cilju njihovog što efikasnijeg formiranja.<sup>[254]</sup> Prikazana metoda ultrazvučnog procesiranja omogućila je formiranje specifičnih „jezgro-omotač“ struktura PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim lekom za koju se očekuje da može biti od velikog značaja prilikom buduće, potencijalne primene ovog materijala u biomedicini.

Kao što je napomenuto obe komponente PLGA/HAp „jezgro-omotač“ strukture, PLGA i HAp, bile su u mogućnosti da vežu jedan deo klindamicina u toku procesa njegove inkapsulacije. Precipitacija polimera tokom formiranja PLGA/HAp čestica omogućila je njegovo vezivanje jednog dela antibiotika iz rastvora. Slična situacija zapažena je i prilikom procesiranja PLGA sa klindamicinom bez prisustva HAp-a. Sa druge strane, primećeno je da HAp takođe ima mogućnost da veže jedan deo klindamicina iz rastvora u toku procesiranja. U slučaju procesiranja klindamicina sa HAp-om, apatit je primenjen kao čvrsta faza dispergovana u rastvoru antibiotika tako da je zbog uređenosti njegove strukture lek bio adsorbovan za njegovu površinu. Sposobnost HAp-a da adsorbuje različite vrste lekova je poznata i objašnjena je preko elektrostatičkih interakcija između  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{PO}_4^{3-}$  jona i suprotno naelektrisanih grupa molekula leka.<sup>[255]</sup> Takođe treba primetiti da udeo antibiotika koji je zadržan u okviru PLGA/HAp strukture približno odgovara srednjoj vrednosti procentualnih udela klindamicina zadržanog u okviru PLGA i HAp-a odvojeno. Različite sposobnosti PLGA i HAp-a da vežu klindamicin u slučaju kada su odvojeni i kada su u okviru kompozita mogu se pripisati promeni gustine površinskog naelektrisanja koje je delimično kompenzovano između PLGA i HAp-a prilikom formiranja kompozita. Sa stanovišta činjenice da su i PLGA i HAp negativno naelektrisani u najvećem delu opsega pH, kao i da je apsolutna vrednost z-potencijala PLGA veća u odnosu na apsolutnu vrednost z-potencijala HAp-a, veća je

verovatnoća interakcije klindamicina sa njima preko hidrofobnog dela molekula. Centralni deo njegovog hidrofobnog dela je pirolski prsten preko koga on lakše interaguje sa PLGA i HAp-om u odnosu na suprotni hidroksilovani metil-sulfidni deo koji odlikuje hidrofilnost (slika 5.2).

Utvrđeno je da se procesiranjem PLGA kao i formiranjem PLGA/HAp, PLGA/klindamicin ili PLGA/HAp/klindamicin struktura površinske karakteristike polimera menjaju. Slab hidrofilni karakter PLGA sa inkapsuliranim klindamicinom uvećan je u odnosu na neprocesirani PLGA.<sup>[256]</sup> Sa građenjem kompozita sa apatitom ova hidrofilnost se smanjuje što se može pripisati građenju „jezgro-omotač“ struktura. Hidrofilnost PLGA/klindamicina zajedno sa visokom apsolutnom vrednošću z-potencijala ukazuje na višu gustinu hidrofilnih grupa prisutnu na površini PLGA u poređenju sa gustinom hidrofilnih grupa koje su prisutne na površini PLGA/HAp i PLGA/HAp/klindamicina. Kao što je već predloženo, PLGA i klindamicin radije interaguje preko hidrofobnog dela molekula ovog leka. U ranijim istraživanjima je pokazano da nakon inkapsulacije ampicilina u okviru PLGA, hidrofilni deo molekula inkapsuliranog leka interaguje sa hidrofobnom unutrašnjošću polimera, dok hidrofilni deo PLGA ostaje orijentisan ka površini. Ova procedura podrazumeva jednu od strategija za površinsku modifikaciju biodegradabilnih poliestara.<sup>[257]</sup> U skladu sa tim, nakon inkapsulacije hidrofilne supstance (u ovom slučaju klindamicina) u okviru PLGA čestica, ona interaguje sa hidrofobnim grupama ovog polimera. Iz tog razloga veća gustina hidrofilnih grupa prisutna je na površini polimera. Ipak, kada je HAp prisutan u okviru PLGA situacija postaje drugačija što i objašnjavaju prethodno navedene fizičke interakcije između PLGA i HAp-a u okviru kompozita. Uzimajući u obzir izrazito hidrofilni karakter HAp-a, on interaguje sa hidrofobnim grupama PLGA. U tom slučaju, obzirom na rezultujući ugao kvašenja i apsolutnu vrednost z-potencijala, veća gustina hidrofobnih grupa prisutna je na površini kompozitnih čestica. Slična situacija prisutna je i u PLGA/HAp/klindamicinu.

## **5.2. DEGRADACIJA PLGA/HAP MATERIJALA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM I PROCES OTPUŠTANJA LEKA**

---

Pokazano je da formiranje biohibridnih materijala omogućava postizanje unapređenih strukturnih i funkcionalnih svojstava rezultujućih materijala.<sup>[258]</sup> Sa tog stanovišta moguće je očekivati promenu degradacionog mehanizma polimernog dela PLGA/HAp kompozita u poređenju sa čistim PLGA polimerom usled prisustva biokeramičke faze. Sličan efekat primećen je u slučaju degradacije polimernog dela PLGA/TCP kompozita. U tom slučaju postupno rastvaranje TCP faze i posledično otpuštanje hidroksilnih jona bili su u mogućnosti da neutralizuju kisele produkte koji nastaju degradacijom polimera, koja je hidrolitički proces. Kao rezultat, prisustvo TCP faze omogućilo je produženo vreme degradacije polimernog dela kompozita.<sup>[199]</sup> Očekuje se da bi prisustvo HAp-a u PLGA/HAp-u moglo da utiče na kinetiku degradacije polimernog dela ovog kompozita, kao i da bi prisustvo klindamicina u okviru obe faze PLGA/HAp kompozita moglo da utiče kako na kinetiku njegovog postepenog otpuštanja iz ovog nosača leka tako i na proces njegove degradacije.

### **5.2.1. KONTROLISANO OTPUŠTANJE AKTIVNIH KOMPONENTI IZ PLGA/HAP-A**

---

U okviru PLGA/HAp kompozitnog materijala inkapsulirane su dve forme klindamicina-klindamicin-fosfat i klindamicin-baza. Klindamicin-fosfat je biološki neaktivni oblik ovog leka sposoban da se u organizmu, nakon enzimske aktivnosti, transformiše u biološki aktivan oblik klindamicin-bazu.<sup>[209]</sup> Važnost fosfatnog oblika ovog leka vezana je za njegovu izrazito bolju rastvorljivost u vodenoj sredini i bolje transportne sposobnosti čime se postižu njegova brža apsorpcija i brža aktivnost.<sup>[203]</sup> Zbog navedenih karakteristika, klindamicin-fosfat predstavlja proaktivnu formu klindamicina koja se najčešće primenjuje u praksi.<sup>[203],[209]</sup> Međutim, velika rastvorljivost, dostupnost i aktivnost fosfatne forme ovog leka mogu da uzrokuju: oscilacije u aktivnoj koncentraciji leka u krvnoj plazmi, visoku koncentraciju leka u momentu neposredno nakon primene terapije i postizanje koncentracije leka iznad granice toksičnosti. Kontrolisana dostava samo ove forme klindamicina mogla bi biti uspostavljena u kratkom vremenskom intervalu. Inkapsuliranje obe, fosfatne i bazne, forme ovog leka je koncept na osnovu kog se očekuje uspostavljanje veće kontrole kako nad koncentracijom leka koji se odpušta tako i nad periodom u toku kog se odpuštanje leka dešava.

Uzimajući u obzir sigmoidalni oblik profila otpuštanja obe forme klindamicina kao i njegove ukupne količine koja se sa vremenom otpušta postignuta je kontrola nad ovim procesom. Oblik kriva otpuštanja pokazuje dvostepeni proces: prvi korak odgovara povećanom otpuštanju klindamicin-fosfata dok drugi odgovara povećanom otpuštanju klindamicin-baze. Oba koraka pokazuju po dva segmenta: segment sporijeg i segment bržeg otpuštanja leka. U skladu sa primećenim promenama u promeni brzine otpuštanja određene forme klindamicina čitav proces je podeljen na četiri segmenta. (slika 4.14 u poglavlju 4.2.1. Analiza otpuštanja klindamicina iz PLGA/HAp kompozitnog materijala i sa površine HAp-a).

Rastvorljivost klindamicin-fosfata u vodi je izrazito visoka i iznosi više od 150 mg/ml.<sup>[253]</sup> Znatno veća rastvorljivost ove forme leka u odnosu na klindamicin-bazu (0.5 mg/ml)<sup>[203]</sup> podrazumeva veći afinitet ka difuziji u pravcu oblasti veće rastvorljivosti (okružujući vodeni rastvor medijuma pomoću kog su simulirani fiziološki uslovi) odnosno ka oblasti manje koncentracije, kao što je to slučaj kod kontrolisanog otpuštanja većine supstanci koje imaju dobru rastvorljivost u vodi a koje se otpuštaju iz polimernog nosača.<sup>[149],[259]</sup> Iz tog razloga permitivnost ove forme leka je veća i on se otpušta brže. U toku ovog perioda, otpuštanje druge, bazne, forme leka teče sporije što je i rezultovalo njegovom nižom koncentracijom. Povećana brzina otpuštanja bazne forme leka započinje kasnije u periodu kada otpuštanje prve fosfatne forme biva usporeno. Ovakav koncept kontrole nad procesom otpuštanja dve forme leka pokazuje mogućnost za produženu dostavu.

### 5.2.2. DEGRADACIJSKI PROFIL POLIMERNOG DELA PLGA/HAP KOMPOZITA

---

Glavni mehanizmi u toku kontrolisanog otpuštanja leka su: (i) desorpcija sa površine, (ii) difuzija iz unutrašnjosti nosača leka (polimerne matrice ili polimernog sloja) i (iii) otpuštanje praćeno erozijom nosača.<sup>[149]</sup> Postoje mnogi faktori koji imaju sposobnost da utiču na ove mehanizme usled čega se i dobijaju različiti profili otpuštanja leka.<sup>[260]</sup> Generalno neki od najvažnijih faktora koji imaju sposobnost da utiču na mehanizam otpuštanja leka su: priroda molekula leka koji se otpušta, osobine matrice koja predstavlja nosač kao i kinetika promena svojstava matrice u toku procesa otpuštanja.<sup>[141]</sup>

Proces otpuštanja klindamicina u vidu fosfata i baze, dešavao se simultano sa postepenom degradacijom polimernog dela PLGA/HAp kompozitnog nosača. Iz tog razloga različite faze

koje su zapažene u toku degradacije kompozita podeljene su u skladu sa četiri segmenta na koje je podeljena kinetika otpuštanja leka.

**Prvi segment.** Početak otpuštanja klindamicina iz PLGA/HAp-a karakteriše odsustvo efekta naglo otpuštanja. Iz literature je poznato da postoje različiti mehanizmi efekta naglog otpuštanja leka. <sup>[141],[144],[149],[261],[262]</sup> Njegova pojava zavisi od faktora kao što su: (i) osobine molekula leka (npr. molarna masa- lekovi niže molarne mase se otpuštaju znatno brže u odnosu na one čija je molarna masa veća; i rastvorljivost- lekovi koje karakteriše veća rastvorljivost u vodi se otpuštaju brže i odlikuju ih naglo otpuštanje praćeno daljim postepenim otpuštanjem količine koja je ostala u nosaču) <sup>[261]</sup> (ii) distribucija leka u okviru nosača (npr. površinska adsorpcija ili prisustvo leka veoma blizu površine nosača uzrokuju naglo inicijalno otpuštanje) <sup>[141]</sup>, (iii) veličina i oblik čestica nosača (efekat naglog otpuštanja intenzivniji je u slučaju malih dimenzija čestica nosača),<sup>[262]</sup> (iv) osobina lanaca polimernih nosača<sup>[144]</sup> (odsustvo lanaca nižih molarnih masa smanjuje mogućnost za pojavu efekta naglog otpuštanja).

Uzimajući u obzir veliku rastvorljivost klindamicin-fosfata i male, submikronske dimenzije čestica PLGA/HAp-a koje su imale funkciju nosača leka, pojava inicijalnog naglog otpuštanja leka bi bila očekivana. Od ranije je poznato da je primena „jezgro-omotač“ struktura u funkciji nosača leka od velike koristi upravo zbog sposobnosti minimizacije efekta naglog otpuštanja i da pruža mogućnost postepenog otpuštanja supstanci koje odlikuje dobra rastvorljivost u vodi. <sup>[262],[263]</sup> U skladu sa tim, odsustvo ovog efekta je moguće pripisati primeni „jezgro-omotač“ struktura kao nosača leka kao i odsustvu klindamicina na površini PLGA/HAp-a i njegovoj inkapsulaciji u okviru kompozitnih čestica. Važnost formiranja ovakvih struktura u kojima je HAp jezgro u polimernom omotaču treba istaći obzirom na to da je primećeno da je u slučaju formiranja HAp omotača na PLGA jezgru postignut potpuno drugačiji profil koji uključuje efekat naglog otpuštanja. <sup>[118]</sup> Sa druge strane, obzirom na to da su primarno formirane PLGA/HAp čestice imale tendenciju grupisanja u okviru pravilnih, planarnih struktura, (slika 4.2 u poglavlju 4.2.2. Morfološke promene PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom u toku procesa degradacije) odsustvo ovog efekta ukazuje na to da su ove čestice imale svojstva čitavih struktura više nego svojstva pojedinačnih submikronskih sfera. To podrazumeva da su primarno formirane sfere usled svoje nestabilnosti u vodenom okruženju rastvora PBS-a kao i usled tendencije ka sprečavanju

difuzije vode unutar njih, započinjale međusobno povezivanje i delimično srastanje sa susednim sfernim česticama u cilju građenja stabilnijih struktura većih dimenzija.

U toku ovih naglih morfoloških promena, jedan deo štapićastih čestica HAp-a se pojavljuje na površini polimernog omotača. Mala količina klindamicina koja biva otpuštena u toku ovog segmenta može biti pripisana njegovoj desorpciji sa površine ovih čestica HAp-a. Difuzija molekula klindamicin-fosfata kroz polimernu matricu ka vodenom okruženju svakako ima svoj doprinos u količini leka koja je otpuštena u ovom segmentu. Ovaj molekul ima veliku molarnu masu, ali je u isto vreme njegova rastvorljivost u vodi izrazito velika što doprinosi sposobnosti njegove difuzije. Ipak doprinos difuzije klindamicina u ovom segmentu je mali (proporcionalno maloj koncentraciji otpuštenog leka) što je moguće pripisati makromolekulskim osobinama PLGA polimernog omotača. U ranijim istraživanjima je primećeno da se prilikom otpuštanja hidrofilnih i hidrofobnih supstanci iz PLGA sfera primenjenih kao nosača, neposredno pre početka ovog procesa javlja efekat polimerne barijere koji je posledica promene površinskih slojeva polimernog omotača koji su direktno u kontaktu sa okružujućim vodenim medijumom. <sup>[262]</sup> Odsustvo promena u srednjim vrednostima molarnih masa i indeksa polidisperznosti polimernog dela PLGA/HAp-a zajedno sa smanjenjem Tg vrednosti ukazuje na pojavu povećane pokretljivosti lanaca usled prisustva određenih interakcija. Obzirom na otpuštanje leka, ove interakcije se najverovatnije dešavaju između polimernih lanaca i molekula difundujućeg leka. Ovaj tip difuzije je poznat kao molekulski kontrolisana difuzija. Od ranije je poznato da je u slučaju kada je difuzija leka brži proces u odnosu na eroziju polimerne matrice, njegovo otpuštanje je vođeno difuzijom. Kada su u toku ovog procesa uključene interakcije molekula leka sa polimernim lancima ova difuzija se svrstava u tip molekulski kontrolisane difuzije. <sup>[149]</sup> Treba napomenuti da u ovom stadijumu još nisu primećene razlike u brzini degradacije između polimernog dela PLGA/HAp-a sa i bez klindamicina.

**Drugi segment.** Povećana mobilnost polimernih lanaca, uzrokovana difuzijom u vodi rastvornih molekula leka, omogućila je veću penetraciju vode unutar polimerne matrice. To je posledica poznatog plastizirajućeg efekta koji voda stvara u polimerima kao što je PLGA. <sup>[163]</sup> Ova pojava može objasniti začetak formiranja pora u ovoj fazi procesa degradacije. Sličan efekat je primećen u toku otpuštanja u vodi rastvornog rodamina iz PLGA mikrosfera. Prisustvo malih unutrašnjih pora unutar većih površinskih ukazuje na dublji prolazak vode do

unutrašnjosti slojeva polimernih struktura. Klindamicin-fosfat kao rastvorljivija forma inkapsuliranog leka intenzivno difunduje ka vodenom okruženju i posledično se otpušta u većoj količini. U isto vreme dolazi do sporih promena srednjih vrednosti molarnih masa, indeksa polidisperznosti i Tg vrednosti polimera što ukazuje na to da je degradacija polimera na početku. U skladu sa tim sva količina leka koja je u ovom segmentu otpuštena uzrokovana je intenzivnom difuzijom usled pojačane apsorpcije vode.

**Treći segment.** Uzimajući u obzir pad srednjih vrednosti molarnih masa, pad Tg vrednosti i povećanje indeksa polidisperznosti polimernog dela PLGA/HAp kompozita, u toku trećeg segmenta procesa degradacije započinje intenzivnija degradacija polimera. Povećanje indeksa polidisperznosti karakteristično je za proces slučajnog, nepreferentnog, kidanja lanaca<sup>[163]</sup> i ukazuje na prisustvo polimernih vrsta niže molarne mase koje nisu bile u mogućnosti da difunduju izvan materijala nasuprot njihovoj povećanoj rastvorljivosti. Pored toga, morfološka razlika unutrašnjosti u poređenju sa površinom formiranih kompaktnih, planarnih struktura ukazivala je na zapreminsku eroziju. Njeno prisustvo je najčešće posledica samostalno katalizovane degradacije koja je uzrokovana poliradikalima nastalim u toku hidrolize estarskih veza u prisustvu intenzivno adsorbovane vode. U toku ovog procesa penetrirana voda indukuje formiranje kiselih molekulskih vrsta unutar materijala čija je brzina nastanka obično veća u odnosu na brzinu njihove neutralizacije.<sup>[142]</sup> Kako slične promene nisu registrovane u slučaju polimernog dela PLGA/HAp-a bez inkapsuliranog leka, primećena razlika je ukazivala na njegovu sporiju degradaciju.

**Četvrti segment.** Rušenje planarnih struktura koje su na površini i unutrašnjosti sadržale pore čiji se dijametar progresivno povećavao rezultovao je formiranjem izrazito poroznih mreža. Ovakva struktura je omogućavala veliku kontaktnu površinu između materijala i okružujuće vode što je i omogućilo intenzivnije otpuštanje druge, u vodi manje rastvorne, bazne, forme klindamicina. U skladu sa značajnim smanjenjem srednjih vrednosti molarnih masa i Tg vrednosti kao i velikim povećanjem indeksa polidisperznosti, dešavala se progresivna degradacija polimera. Sniženje Tg vrednosti ispod prosečne temperature ljudskog organizma (37°C) koja je bila jednaka temperaturi pri kojoj su se simulirali fiziološki uslovi u organizmu i pratila degradacija, ukazivalo je na povećanje pokretljivosti polimernih lanaca kao posledice prelaska iz rigidne u viskoelastičnu strukturu.<sup>[142]</sup> Čak i u ovoj fazi koja je u odnosu na sve merene parametre degradacija polimernog dela PLGA/HAp-a sa



inkapsuliranim lekom bila izrazito intenzivna i brza, degradacija polimernog dela ovog kompozita bez inkapsuliranog leka je i dalje bila veoma spora. Na to su najpre ukazivali odsustvo značajnog povećanja brzine promene srednjih vrednosti molarnih masa i indeksa polidisperznosti kao i izuzetno mala promena Tg vrednosti. Treba istaći da je nakon 30 dana degradacije Tg vrednost polimernog dela PLGA/HAp kompozita bez inkapsuliranog klindamicina bila i dalje na 41°C što je odgovaralo Tg vrednosti koju je ovaj kompozit sa inkapsuliranim klindamicinom imao na početku procesa degradacije. Slična situacija je zapažena poređenjem ostalih karakteristika polimernog dela ovog kompozita sa i bez inkapsuliranog leka što je sa sigurnošću upućivalo na to da je nakon ovog perioda degradacija polimernog dela PLGA/HAp-a bez inkapsuliranog leka tek počinjala.

### 5.2.3. DEGRADACIJA PLGA/HAP-A NASUPROT SIMULTANOG OTPUŠTANJA LEKA

---

Poznato je da biodegradabilni polimeri podležu procesu hidrolitičke degradacije koja je inicirana povećanjem koncentracije protona. [163] PLGA u toku degradacije formira kraće lance alkohola i kiselina. [142] Ovi produkti degradacije, koji su kiseli, [163] imaju sposobnost da povećaju lokalnu vrednost pH koja se odnosi na mikro-okruženje. To je jedan od glavnih razloga zbog kog se primena ovog polimera za formiranje materijala za rekonstrukciju i reparaciju kostiju ne preporučuje, obzirom na opasnost da bi pojava ovog lokalnog povećanja pH mogla da dovede do resorbovanja koštanog tkiva. Posledično, primena ovog polimera se ne preporučuje ni za tretman infekcija koštanog tkiva. [264] Istraživanja su pokazala da je ovaj problem moguće rešiti primenom kalcijum-fosfatnih punilaca koji bi imali ulogu u stabilizaciji pH vrednosti biodegradabilnih poliestara. [198], [199], [200] U skladu sa tim formiranje kalcijum-fosfatnih kompozita sa PLGA polimerom je svakako dobro rešenje za pojavu problema lokalne kiselosti. Ranije je već pokazano da formiranje PLGA/kalcijum-fosfatnog kompozita može da modifikuje brzinu degradacije ovog polimera regulisanjem pH vrednosti u mikro-okruženju. U slučaju kada je punilac HAp, naizmenično rastvaranje i rekristalizacija stvaraju bazne produkte kojima se neutrališu kiseli produkti degradacije polimera koji su odgovorni za progresivni napredak ovog procesa čime se brzina hidrolitičke degradacije polimera usporava. [199], [200]

Sporija brzina degradacije PLGA polimera u prisustvu HAp-a je primećena i u ovom radu uz prisustvo veoma malih dnevnih oscilacija pH vrednosti na osnovu čega bi se moglo očekivati

postizanje produženog perioda degradacije koje bi posledično omogućilo duži period otpuštanja zaostalog leka u okviru PLGA/HAp kompozita. Ipak, pokazalo se da pojava interakcija između polimera i u vodi rastvornog leka ima dominantnu ulogu u kontroli procesa degradacije što je omogućilo intenzivniju penetraciju vode unutar materijala i indukovalo autokatalitičku degradaciju koja je proces degradacije ubrzavala. U ovom slučaju priroda obe forme leka koje su inkapsulirane u okviru PLGA/HAp kompozita je uzeta u obzir i dobijene brzine otpuštanja leka koje su postignute mogu se smatrati optimalnim za specifični tip primene ovog materijala u lokalnom tretmanu infekcija koštanog tkiva.

Kako bi materijal bio adekvatno dizajniran za određenu specifičnu namenu neophodno je ustanoviti prisustvo interakcija između leka i polimera kao i doprinos ovih interakcija procesu degradacije polimernog nosača. Važnost ispitivanja ovih interakcija i njihovog uticaja na degradaciju treba posebno istaći iz tog razloga što upravo oni kontrolišu proces otpuštanja leka posredno utičući na finalnu primenljivost materijala u kontrolisanoj dostavi inkapsulirane medicinski aktivne supstance.

### ***5.3. CITOKOMPATIBILNOST I POVRŠINSKE KARAKTERISTIKE PLGA/HAP MATERIJALA SA INKAPSULIRANIM KLINDAMICINOM***

---

U analizi svojstava materijala koji je procesiran u cilju potencijalne primene u oblasti biomedicine, veoma je važno ispitati njegovu bioaktivnost, <sup>[213]</sup> odnosno postojanje interakcija između materijala i ćelija koje pospešuju njihov rast i razvoj, kao i citokompatibilnost, <sup>[216]</sup> odnosno meru u kojoj je materijal podesan da koegzistira u prisustvu ćelija tako da ne utiče na njihov prirodni životni proces u smislu podsticanja procesa degeneracije i umiranja. Površina materijala je u direktnom kontaktu sa okolnim ćelijama tako da njena svojstva u velikoj meri utiču na način interakcije između materijala i ćelija. <sup>[214]</sup>

Pored formiranja kiselih produkata degradacije PLGA polimera koji bi mogli štetno da utiču na ćelije koštanog tkiva drugi nedostatak ovog polimera zbog kog se on smatra materijalom koji nije idealan u tretmanu koštanog tkiva je veoma slaba adhezija ćelija usled vrlo niske hidrofilitnosti njegove površine.<sup>[171]</sup> Danas se mnoge metode primenjuju za funkcionalizaciju površine ovog materijala u cilju poboljšanja njegove kvašljivosti. Pored funkcionalizacije površinskih grupa,<sup>[172]</sup> za poboljšanje površinskih karakteristika ovog materijala primenjuje se i formiranje izrazito poroznih struktura<sup>[265]</sup> kao i formiranje

kompozita. Jedan od načina za poboljšanje kvašljivosti površine je formiranje PLGA/HAp kompozita u vidu struktura kod kojih je PLGA obložen apatitnom fazom. Povećana hidrofilnost rezultujućeg materijala omogućava njegovu bolju bioaktivnost, obzirom na apatitni površinski sloj. <sup>[118],[201]</sup> Ipak, u ovom slučaju nije u potpunosti postignuta kontrola nad procesom otpuštanja leka najverovatnije zbog nagle penetracije velike količine vode unutar materijala. <sup>[118]</sup>

U obrnutom slučaju, kada je PLGA polimerna faza koja oblaže apatitno jezgro, površinske karakteristike su drugačije. Tokom analize procesa degradacije polimernog dela ovog kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom i simultanog otpuštanja leka primećeno je da sa postepenom promenom morfoloških, makromolekulskih i strukturnih osobina dolazi i do postepene promene površinskih svojstava materijala. Kao što je već ranije objašnjeno nakon unošenja PLGA/HAp/klindamicina u vodeno okruženje koje simulira fiziološke uslove, dolazi do penetracije određene količine vode usled prisustva polimernog površinskog sloja i inkapsuliranog u vodi dobro rastvornog leka. Iz tog razloga prvobitno formirane čestice počinju da agregiraju i delimično srastaju što posledično rezultuje smanjenje specifične površine materijala. Agregacija i srastanje čestica u cilju formiranja većih, stabilnijih struktura rezultat su i varijacija vrednosti njihovog površinskog naelektrisanja u ovom periodu. Specifična površina kompozita sa lekom se smanjuje sve do treće nedelje degradacije u vodenom degradacijskom medijumu. Pokazano je da se u tom periodu dešavaju veoma nagle promene morfoloških karakteristika koje su imale za posledicu pojavu štapićastih čestica HAp-a na površini polimerne matrice. Pojava HAp-a na površini materijala doprinosi povećanju njene kvašljivosti. Na taj način postignute su površinske karakteristike veoma slične onima koje su dobijene u slučaju formiranja apatitom presvučenih polimernih čestica. <sup>[118],[201]</sup> U isto vreme veličina površinskog naelektrisanja PLGA/HAp čestica se značajno povećava u poređenju sa prvobitno procesiranim materijalom ukazujući na povećanje gustine hidrofilnih grupa na površini.

Poslednji segment degradacije polimernog dela PLGA/HAp-a odlikuje formiranje izrazito poroznih struktura. Kao posledica intenzivne erozije polimera u ovom stadijumu degradacije, dolazi do značajnog povećanja specifične površine materijala. U ovom periodu takođe dolazi i do smanjenja hidrofilnog karaktera površine najverovatnije zbog prisustva i hidrofilnih i hidrofobnih domena na novonastaloj erozijom formiranoj poroznoj površini. I pored toga, i

nakon 30 dana degradacije materijal ostaje hidrofilan sa kontaktnim uglom koji je manji u odnosu na kontaktni ugao PLGA polimera što znači da je povećanje hidrofilnosti ovog polimera uspešno ostvareno u toku degradacije njegovog kompozita sa apatitom.

Postignute karakteristike PLGA/HAp materijala sa inkapsuliranim klindamicinom ukazuju na mogućnost prevazilaženja problema slabe adhezije ćelija za površinu PLGA usled neodgovarajućih površinskih karakteristika. Od ranije je poznato da negativno naelektrisana površina čestica HAp-a favorizuje adheziju ćelija i ubrzava srastanje tkiva.<sup>[193]</sup> Bioaktivnost HAp-a je jedan od glavnih razloga zbog kog je u slučaju različitih apatitnih kompozita postignuto izrazito unapređenje ćelijskog odgovora.<sup>[174]</sup> U skladu sa tim, pored ranije navedenog značaja prisustva HAp-a u okviru PLGA u cilju regulacije lokalno povećane kiselosti, važno je istaći i sposobnost ovog materijala da poboljša površinske karakteristike rezultujućeg kompozita. Njegova sposobnost da unapredi ova svojstva kompozita ukazuje i na to da bi se mogli očekivati i bolji ćelijski odgovor i manja verovatnoća da organizam registruje materijal kao strano telo, aktivira imuni sistem i odbaci ga uz pojavu zapaljenskih procesa.

*In vitro* analize PLGA/HAp kompozita sa i bez klindamicina u skladu su sa poslednjom pretpostavkom. Analiza citotoksičnosti ovog materijala zasnivala se na: (i) integritetu ćelijske membrane merenom na osnovu sposobnosti bojenja citoplazme nevijabilnih ćelija sa oštećenom ćelijskom membranom (DET test) <sup>[240]</sup>; metaboličke aktivnosti ćelija, odnosno sposobnosti živih ćelija da redukuju u vodi rastvornu tetrazolijumsku so do u vodi nerastvornih produkata formazana pomoću mitohondrijske dehidrogenaze (MTT) <sup>[241]</sup>; i (iii) bojenja ćelija usled apsorpcije neutralno crvenog koji se specifično vezuje za kisele regione vijabilnih ćelija kao što su lizozomi i proliferativna DNK (difuzni agar test) <sup>[242]</sup>. U skladu sa svim primenjenim testovima za analizu citotoksičnosti materijal je pokazao visok stepen citokompatibilnosti sa fibroblastima. Treba napomenuti i progresivan trend citokompatibilnosti u toku vremena inkubacije ćelija sa ovim materijalom u toku kog su se dešavale neke od pomenutih promena površinskih karakteristika materijala. Ovaj progresivni trend registrovan je pomoću MTT metode koja je razvijena kao brza i efektivna metoda za utvrđivanje toksičnog uticaja lekova na mitohondrijsku aktivnost ćelija korelirajući je sa ćelijskom proliferacijom. Metoda se dodatno koristi i za preliminarno ispitivanje citotoksičnog efekta sintetskih lekova i polimernih supstanci rastvornih u vodi. <sup>[241]</sup>

Obzirom na činjenicu da se sa vremenom degradacije kompozita postižu unapređenje hidrofилности i povećanje specifične površine, pozitivan uticaj ovog materijala na ćelije može se očekivati u toku čitavog perioda u toku kog je predviđeno da on bude prisutan u njihovoj blizini. Njegova dobra citokompatibilnost i izražena bioaktivnost su dobar preduslov za predviđanje biokompatibilnosti ovog materijala i sposobnosti za iniciranje procesa ćelijske diferencijacije i osteointegracije.

# ZAKLJUČCI

---

**VI**

U ovoj doktorskoj disertaciji primenom metode ultrazvučnog procesiranja izvršena je sinteza novog kompozitnog materijala izgrađenog iz sfernih čestica PLGA/HAp-a sa strukturom „jezgro-omotač“, u kome je antibiotik klindamicin inkapsuliran u formi aktivne i proaktivne supstance (što je potvrđeno primenom TOF-MS, FTIR i XPS spektroskopije, HPLC hromatografije, SEM, TEM i fluorescentne mikroskopije, kao i metodama za merenje ugla kvašenja, z-potencijala i specifične površine); praćeni su proces degradacije polimernog dela kompozita primenjenog kao nosača leka (primenom GPC,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, DSC, SEM i metoda za analizu površinskih karakteristika) kao i proces simultanog otpuštanja obe inkapsulirane forme leka u simuliranim fiziološkim uslovima (primenom TOF-MS/UpLC metode) i ispitivan je odgovor fibroblastnih ćelija na prisustvo formiranog materijala (primenom DET, MTT i difuznog testa kao i optičke i SEM mikroskopije). Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti sledeće:

- ❖ Optimizacijom metode ultrazvučnog procesiranja postignuta je inkapsulacija klindamicina u okviru PLGA/HAp sfernih čestica srednje veličine 160 nm. Utvrđeno je da izbor rastvarača i nerastvarača polimera značajno utiče na proces inkapsulacije leka i morfološke karakteristike PLGA/HAp kompozitnih čestica. Optimalne morfološke karakteristike čestica PLGA/HAp/klindamicina, koje je odlikovao visok stepen uniformnosti oblika i veličine, kao i specifična „jezgro-omotač“ struktura u kojoj je polimerni omotač bio nanostrukturan, zajedno sa potpunom inkapsulacijom leka postignuti su primenom sistema acetonitril/voda u kom su polimer i klindamicin imali najveću rastvorljivost.
- ❖ Uspostavljen je mehanizam formiranja PLGA/HAp čestica sa inkapsuliranim antibiotikom koji podrazumeva adsorpsiju klindamicina (u obliku fosfatne forme) na površini apatitne faze i njegovu disperziju u okviru polimerne faze (u obliku fosfatne i bazne forme). Tokom ovog procesa apatitne čestice sa adsorbovanim lekom na površini imaju ulogu nukleacijskih centara na kojima polimer precipitira. Polimer u toku precipitacije fizički vezuje jedan deo leka iz rastvora. Na taj način formiraju se pravilne „jezgro-omotač“ čestice sa veoma efikasnom inkapsulacijom leka.
- ❖ Utvrđeno je da tokom procesa formiranja kompozitnih čestica i inkapsulacije leka, klindamicin ima ulogu stabilizacionog agensa koji reguliše morfološke karakteristike kako pojedinačnih komponenti tako i finalno formiranih „jezgro-omotač“ struktura.

Uloga stabilizacionog agensa, pripisana je sternim interakcijama, usled razgranate strukture molekula klindamicina, kao i elektrostatičkim interakcijama, koje on uspostavlja preko svojih polarnih grupa.

- ❖ Sa strane morfoloških i strukturnih karakteristika koje su u ovom slučaju postignute, metoda ultrazvučnog procesiranja optimizovana za inkapsulaciju lekova u okviru „jezgro-omotač“ struktura može biti istaknuta kao veoma jednostavna, ekonomski isplativa i izuzetno efikasna metoda za procesiranje nanostrukturiranih materijala za kontrolisanu dostavu lekova.
- ❖ Može se očekivati da novoformirani materijal izgrađen iz biodegradabilnog polimera i bioaktivne keramike u formi u kojoj polimer gradi omotač a keramika jezgro sa lekom koji je prisutan u formi dispergovanoj u polimernoj matrici kao i u formi adsorbovanoj na površini čestica keramičke faze ima izuzetno velike mogućnosti za potencijalnu primenu u kontrolisanoj dostavi medikamenata. Posebne prednosti primene ovog materijala mogle bi se očekivati prilikom njegove lokalne primene u vidu multifunkcionalnog imlantata u cilju tretmana infekcija koštanog tkiva. Multifunkcionalnost ovog implantata podrazumevala bi sposobnost degradacije polimera, postepeno otpuštanje leka i konačno sposobnost zaostalog HAp-a da nakon završetka terapije podstakne osteointegraciju i zaceljenje mesta na kom je implantat bio ugrađen. Fluorescentno obeležene komponente ovog materijala dodatno doprinose njegovoj funkcionalnosti sa stanovišta mogućnosti lakog detektovanja i praćenja.
- ❖ Uspostavljena je precizna kontrola nad procesom otpuštanja klindamicin-fosfata, kao proaktivne, i klindamicin-baze, kao aktivne forme leka. Zahvaljujući različitim fizičko-hemijskim karakteristikama ove dve forme leka postignuto je kontrolisano otpuštanje najpre proaktivne forme, koju odlikuje veća rastvorljivost, a zatim i ubrzanje otpuštanja aktivne forme leka. Koncept kombinacije aktivne i proaktivne forme leka i njihovog postepenog otpuštanja iz biodegradabilnog nosača može se smatrati jednim od načina za postizanje produžetka perioda u toku kog se lek otpušta uz istovremenu kontrolu njegove koncentracije koja se postiže na mestu infekcije u toku čitavog perioda medikacije. To podrazumeva da bi takav pristup lokalnom tretmanu infekcija koštanog tkiva bio u mogućnosti da reši dosadašnje probleme kontrolisane dostave



antibiotika koji su vezani za nedovoljnu koncentraciju leka prisutnu na mestu infekcije koju prati pojava rezistentnih vrsta patogena.

- ❖ Polimerni deo PLGA/HAp kompozita ima sposobnost postepene degradacije koja traje više od 30 dana čime se omogućava precizna kontrola nad procesom oslobađanja leka. Procesi degradacije polimernog dela kompozita i postepenog otpuštanja leka dešavaju se simultano i izuzetno su povezani. Tokom difundovanja ka vodenoj sredini, lek interaguje sa polimernim lancima, povećava njihovu pokretljivost i omogućava bržu penetraciju vode unutar materijala. Ovaj uticaj leka treba naročito istaći obzirom da on zavisi od prirode njegovih molekula i može da utiče na kinetiku procesa polimerne degradacije.
- ❖ U odsustvu inkapsuliranog leka, degradacija polimernog dela PLGA/HAp kompozita je veoma spor proces. Sporij degradaciji doprinosi prisustvo apatitne faze koja je u stanju da inhibira pojavu lokalne kiselosti koja nastaje usled hidrolize estarskih veza čime se kontroliše autokatalitička degradacija i smanjuje se brzina kojom se ovaj proces odvija. Prvi od dva problema zbog kojih se PLGA ne preporučuje u lokalnoj, kontrolisanoj dostavi lekova u cilju lečenja bolesti koštanog tkiva odnosi se na problem kiselosti koji se povezuje sa iritacijom tkiva, resorbovanjem koštane mase i odbacivanjem implantata. Ovaj nedostatak PLGA polimera moguće je izuzetno efikasno prevazići formiranjem kompozita za apatitnom fazom.
- ❖ U toku procesa degradacije dešavaju se promene morfoloških, strukturnih i površinskih karakteristika PLGA/HAp/klindamicina. U toku ovih promena HAp ima veoma važnu ulogu koja se prvenstveno odnosi na doprinos dinamičnoj promeni površinskih karakteristika. Najvažniji doprinos apatita površinskim osobinama materijala je povećanje hidrofилности površine kompozita koje nastaje tokom rušenja „jezgro-omotač“ strukture. Kako se drugi nedostatak PLGA, koji se vezuje za njegovu primenu u izgradnji koštanih implantata, odnosi na izuzetno nisku kvašljivost površine zbog koje ćelije nemaju mogućnost dobre adhezije, pokazano je da se i ovaj nedostatak može veoma uspešno rešiti tokom formiranja kompozita.
- ❖ Znatno poboljšanje hidrofилности i povećanje specifične površine koji se postižu tokom degradacije kompozita u fiziološkim uslovima ukazuju na mogućnost dobre interakcije ovog materijala sa živim ćelijama i smanjenje mogućnosti da on bude odbačen iz

organizma kao posledica reakcije imuniteta na prisustvo stranog tela u toku *in vivo* primene implantata izgrađenih od ovog materijala. Visok stepen citokompatibilnosti ovog materijala sa L9292 fibroblastima iz miša i MRC-5 humanim fibroblastima iz pluća, je u dobroj korelaciji sa prethodnim tvrđenjem.

- ❖ Shodno dobijenim morfološkim, strukturnim, makromolekulskim, degradacijskim i citokompatibilnim karakteristikama PLGA/HAp materijala, može se zaključiti da on pokazuje veliki potencijal za biomedicinsku primenu u tretmanu infektivnih bolesti koštanog tkiva. Kako je postignut nivo inkapsulacije klindamicina u okviru kompozita koji shodno literaturi odgovara koncentraciji koja se preporučuje za terapijske kao i za profilaktičke svrhe, materijal se može potencijalno primeniti kao antibakterijski omotač implantata za zamenu kostiju u cilju preventive razvoja post-implantacione infekcije kostiju ili zglobova (PLGA/HAp sa 1% inkapsuliranog klindamicina) ili kao punilac za tretman infekcijom zahvaćenog koštanog tkiva (PLGA/HAp sa 10% inkapsuliranog klindamicina).

## SADRŽAJ SLIKA

### GRAFIČKI IZVOD

**Slika 1:** Procesiranje, degradacija polimera, otpuštanje leka i citokompatibilnost poli(D,L-laktid-koglikolid)/hidroksiapatit/klindamicina

### I TEORIJSKI DEO

**Slika 1.1.** Ilustracija tipova dostave medikamenata primenom nosača

**Slika 1.2.** Ilustracija prednosti nanomaterijala u odnosu na konvencionalne na primeru hidroksiapatit/hidrogel nanokristalnog supstrata<sup>[43]</sup>

**Slika 1.3.** Ilustracija enzimski katalisanog otpuštanja leka<sup>[49]</sup>

**Slika 1.4.** (a) SEM mikrografija predstavlja morfologiju humanog eritrocita, (b) ilustracija hipo-osmotske dijalize- metode za inkapsulaciju leka unutar eritrocita. <sup>[51]</sup>

**Slika 1.5.** TEM mikrografije *Staphylococcus Haemolyticus* bakterije (a,b), SEM mikrografija bakterije *Escherihia Coli* (c); ilustracija mehanizma delovanja (d) i strukture HIV virusa (e). <sup>[53]</sup>, <sup>[54]</sup>

**Slika 1.6.** (a) Sastav ćelije sisara; (b) morfološke karakteristike različitih tipova ćelija; (c) građa ćelijske membrane.<sup>[27]</sup>

**Slika 1.7.** Ilustracija formiranja multifunkcionalnog nanočestičnog sistema. <sup>[27]</sup>

**Slika 1.8.** Formulacije jezgro-omotač struktura: (a), (b), (c) sferne i (d) oblika različitog od sfernog. <sup>[27]</sup>

**Slika 1.9.** Različite morfološke karakteristike čestica: (a) polistirenski (PS) cik-cak niz,<sup>[82]</sup> (b) pentagonalna bipiramida sastavljena iz sedam PS sfernih čestica,<sup>[83]</sup> (c) elipsoidne PS čestice, <sup>[84]</sup> (d<sub>1-4</sub>) poli(l-laktid) i poli(glikolid) sa doksorubicinom, <sup>[85]</sup> (e) optički adhezivne polimerne čestice valjkastog oblika,<sup>[86]</sup> (f) PS čestice torusnog oblika,<sup>[87]</sup> (g) PS čestice levkastog oblika, <sup>[88]</sup> (h) štapići poliTPGDA, <sup>[89]</sup> (i<sub>1-2</sub>) PS eliptični diskovi i čestice oblika eritrocita, <sup>[90]</sup> (j) poli(etilen-glikolna) (PEG) čestica kapljicaškog oblika, <sup>[91]</sup> (k) konusne čestice PEG-a; interakcija između alveolarnog makrofaga (braon) i čestica PS (purpurno) različitog oblika <sup>[92]</sup> (l<sub>1-3</sub>).

**Slika 1.10.** Metoda mikroemulzije: (a) miniemulziona polimerizacija, (b) procesiranje prethodno sintetisanog polimera kombinacijom metode rastvarač/nerastvarač i metode mikroemulzije, (c) formiranje nanokapsula kombinacijom fazne separacije, nanoprecipitacije i površinske polimerizacije miniemulzionom tehnikom, (d) trostepeni proces formiranja agregata i njihove inkapsulacije u okviru polimerne matrice, (e) formiranje biodegradabilnog i fluorescentno obeleženog polilaktida sa inkapsuliranim gvožđe-oksidom kombinacijom miniemulzije i metode rastvarač/nerastvarač. <sup>[98]</sup>

**Slika 1.11:** *Metoda templiranja: (a) opšti princip metode, (b) primer formiranja metalne čestice i čestice metala presvučene polimerom.*<sup>[78]</sup>

**Slika 1.12:** *Infekcije uzrokovane implantiranjem: (a) statistički podaci o broju izvršenih operacija ugrađivanja veštačkog kuka i veštačkog kolena (b) broj slučajev kod kojih se razvila infekcija (podaci iz Centra za kontrolu i prevenciju bolesti, Atlanta); (c) ilustracija formiranja bakterijskog biofilma i najčešći uzročnici implantatom uzrokovanih infekcija.*<sup>[102]</sup>

**Slika 1.13:** *Implantirajuća pumpa za dostavu antibiotika: (a) mikroelektronika i (b) mehanizam ponovnog punjenja. Implantat izgrađen iz kompozitnih vlakana sa inkapsuliranim gentamicinom: (c<sub>1</sub>) presek vlakna i (c<sub>2</sub>) fina struktura preseka implantata.*<sup>[1], [114]</sup>

**Slika 1.14:** *Shema za formiranje materijala sa gentamicinom i tobramicinom u zavisnosti od namene koja se primenjuje u praksi.*<sup>[113]</sup>

**Slika 1.15.:** *Strukturna formula PLGA polimera sa udelom laktidne i glikolidne komponente m:n (a); ilustracija zapreminske degradacije PLGA i lokalnog povećanja kiselosti (b).*<sup>[164]</sup>

**Slika 1.16:** *In vivo konverzija klindamicin-2-fosfata u klindamicin bazu pomoću enzima.*<sup>[209]</sup>

**Slika 1.17:** *Koncentracije leka u krvnoj plazmi: (a) dobijene nakon intravenske administracije 150 mg klindamicin-2-fosfata u 50 ml vode, (b) dobijene nakon intravenske administracije klindamicin-2-fosfata i oralne administracije klindamicin-hidrohlorida.*<sup>[209]</sup>

### III EKSPERIMENTALNI DEO

**Slika 3.1.** *Ultrazvučna sonda visokog intenziteta koja je korišćena u toku procesiranja kompozita i inkapsulacije klindamicina.*

**Slika 3.2.** *Procedura za obeležavanje PLGA pomoću fluoresceinamina.*<sup>[231]</sup>

**Slika 3.3.** *Mehanizam vezivanja alizarina za površinu HAp-a.*<sup>[232]</sup>

**Slika 3.4.** *Mehanizam vezivanja tetra metil-rodamin-izocijanata za klindamicin.*

**Slika 3.5.** *Vodeno kupatilo sa mešanjem koje je korišćeno za praćenje procesa degradacije polimernog dela PLGA/HAp kompozita i otpuštanje klindamicina.*

**Slika 3.6.** *Promena pH vrednosti degradacijskog medijuma u toku degradacije PLGA/HAp kompozita (●) i PLGA/HAp/klindamicina (○).*<sup>[143]</sup>

**Slika 3.7.** *Kalibraciona kriva zavisnosti površine pika klindamicina ( $t_{retencije} = 5.4$  min) od koncentracije u vodi.*

**Slika 3.8.** *Kalibraciona kriva korišćena u GPC metodi.*

#### IV REZULTATI

- Slika 4.1:** Morfologija čestica PLGA/HAp/klindamicina dobijenih primenom: acetona/etanola (a,b), acetona/izopropanola (c,d), acetona/(razblaženog etanola) (e,f) i acetonitrila/izopropanola (g,h) acetonitrila/(razblaženog etanola) (i,j) kao sistema rastvarač/nerastvarač polimera. <sup>[23]</sup>
- Slika 4.2:** Morfologija čestica PLGA/HAp/klindamicina dobijenih primenom: acetona/vode (a), smeše (acetona/acetonitril, 1:1)/vode (b,c) i acetonitrila/vode (d) kao sistema rastvarač/nerastvarač polimera; planarni raspored čestica (e,f) i morfologija na površini i na preseku planarnih struktura (g,h). <sup>[23]</sup>
- Slika 4.3:** Nanostrukturne čestice PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom. <sup>[23]</sup>
- Slika 4.4:** TOF-MS spektar rastvora PLGA/HAp/klindamicina u acetonitrilu. <sup>[143]</sup>
- Slika 4.5:** Hromatogrami klindamicina u vodi (a), supernatanta dobijenog nakon procesiranja PLGA/HAp kompozita bez klindamicina (b), supernatanta dobijenih nakon procesiranja klindamicina sa: PLGA (c), HAp (d) i PLGA/HAp (e).
- Slika 4.6:** IC spektri HAp-a (a), HAp/klindamicina (b) i klindamicina (c)
- Slika 4.7:** Stereološka analiza morfoloških parametara čestica PLGA/HAp kompozita sa: 1% (a,b,c), 5% (d,e,f) i 10% (g,h,i) klindamicina. <sup>[23]</sup>
- Slika 4.8:** Morfološke karakteristike HAp-a (a,b) i PLGA (c,d) sa klindamicinom. <sup>[23]</sup>
- Slika 4.9:** TEM mikrografije čestica PLGA/HAp kompozita sa inkapsuliranim klindamicinom u koncentraciji od 10 mas.%. <sup>[23]</sup>
- Slika 4.10.** Slike snimljene fluorescentnom mikroskopijom: (a) PLGA-fluorescein (zeleni filter), (b) HAp-alizarin (crveni filter), (c) klindamicin-rodamin (crveni filter); PLGA/HAp/klindamicin- (d) zeleni filter, (e) crveni filter, (f) zeleni i crveni filter.
- Slika 4.11:** RFS spektri HAp-a: spektar površine sa i bez klindamicina (a), spektri profila HAp-a (b) i HAp/klindamicina (c). <sup>[23]</sup>
- Slika 4.12:** RFS spektari: spektar površine PLGA/HAp/klindamicina (a), O 1s (b) i C 1s (c) visokorezolucioni spektri površine; C 1s spektar PLGA/HAp bez klindamicina (d); profilni spektri PLGA/HAp-a bez (e) i sa (f,g) klindamicinom. <sup>[23]</sup>
- Slika 4.13:** Kvašenje PLGA/klindamicin (a), PLGA/HAp/klindamicin (b) PLGA/HAp (c) materijala dobijenih nakon procesiranja u polju ultrazvuka. <sup>[143]</sup>
- Slika 4.14:** Kumulativne krive otpuštanja ukupnog klindamicina (●), klindamicin-2-fosfata (▲) i klindamicin-baze (□) u toku vremena (a); relativna količina ukupnog klindamicina otpuštena u toku vremena (b). <sup>[143]</sup>
- Slika 4.15:** Kumulativna kriva otpuštanja klindamicin-2-fosfata sa površine HAp-a.

**Slika 4.16.** Morfološke karakteristike PLGA/HAp/klindamicina nakon prvih pet dana degradacije (segment I na slici 4.14): agregacija manjih (a) i većih (b) sfernih čestica, pojava štapića apatita na površini sfernih čestica (c) i početak formiranja morfologije kompaktnih planarnih struktura (d).<sup>[143]</sup>

**Slika 4.17.** Morfološke karakteristike PLGA/HAp/klindamicina u periodu između 5. i 11. dana degradacije (segment II na slici 4.14): spoljašnje pore na površini i oko sfernih čestica (a), prisustvo velikih i malih površinskih pora (b), prisustvo malih unutrašnjih pora (c) i morfologija kompaktnih planarnih struktura (d).<sup>[143]</sup>

**Slika 4.18.** Morfološke karakteristike PLGA/HAp/klindamicina u periodu između 11. i 21. dana degradacije (segment III na slici 4.14): porozna površina planarnih struktura (a), razlika u morfologiji površine i unutrašnjosti materijala (b), spoljašnje (c) i unutrašnje (d) pore.<sup>[143]</sup>

**Slika 4.19.** Morfološke karakteristike PLGA/HAp/klindamicina u periodu između 21. i 30. dana degradacije (segment IV na slici 4.14): značajno povećanje površinskih i unutrašnjih pora (a,b,c,d) i formiranje poroznih filmova (e,f).<sup>[143]</sup>

**Slika 4.20:** <sup>1</sup>H NMR spektri PLGA/HAp-a pre (a) i nakon (b) i PLGA/HAp/klindamicina pre (c) i nakon (d) procesa degradacije.

**Slika 4.21:** Raspodele molarnih masa polimera u okviru PLGA/HAp (a) i PLGA/HAp/klindamicina (b) u toku procesa degradacije; komparativne krive raspodela molarnih masa polimera u PLGA/HAp-u bez i sa klindamicinom pre i nakon procesa degradacije (c); kriva promene  $M_w$  (d),  $M_n$  (e) i  $M_w/M_n$  (f) u toku procesa degradacije za PLGA/HAp sa (▲) i bez (■) klindamicina.<sup>[143]</sup>

**Slika 4.22:** DSC grafici PLGA/HAp materijala bez (a) i sa (b) klindamicinom pre i nakon procesa degradacije; eksperimentalne (■) i fitovane (—) vrednosti temperature staklastog prelaza ( $T_g$ ) polimera u PLGA/HAp (c) i PLGA/HAp/klindamicinu (d) u toku procesa degradacije sa odgovarajućim procentualnim udelima promene početne  $T_g$  vrednosti predstavljene u vidu insertovanih grafika.<sup>[143]</sup>

**Slika 4.23:** Kvašenje PLGA/klindamicin (a), PLGA/HAp/klindamicin (b) PLGA/HAp (c) materijala dobijenih nakon procesiranja u polju ultrazvuka.

**Slika 4.24:** Rezultati DET testa citotoksičnosti PLGA/HAp kompozita sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina dobijeni na MRC-5 i L929 ćelijskim linijama nakon inkubacije u toku 24h.

**Slika 4.25:** Rezultati MTT testa citotoksičnosti PLGA/HAp kompozita sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina dobijeni na MRC-5 i L929 ćelijskim linijama nakon inkubacije u toku različitih vremenskih intervala.

**Slika 4.26:** Optičke mikrografije L929 i MRC-5 kontrolnih ćelija (a,b) i istih ćelija na površini PLGA/HAp kompozita sa različitim sadržajem inkapsuliranog klindamicina: 0% (c,d), 1% (e,f), 5% (g,h) i 10% (i,j).

**Slika 4.27:** Morfologija ćelija u blizini površine PLGA/HAp/klindamicina.

**Slika 4.28:** SEM mikrografije MRC-5 (a,b) i L929 (c,d) ćelija vezanih za površinu PLGA/HAp/klindamicina.

## V DISKUSIJA

**Slika 5.1:** Shematski prikaz uticaja rastvorljivosti klindamicina i PLGA u sistemu rastvarač/nerastvarač na morfološke karakteristike i inkapsulaciju klinamicina u okoviru PLGA/HAp-a. [23]

**Slika 5.2:** Predloženi mehanizam formiranja PLGA/HAp/klinamicin nanostrukturnih čestica sa „jezgro-omotač“ strukturom. [23]

## SADRŽAJ TABELA

---

---

### I UVOD

**Tabela 1.1:** Svojstva pojedinih antibiotika koji su do sada korišćeni za inkapsulaciju u cilju kontrolisane dostave. [132],[133]

**Tabela 1.2:** Prednosti i nedostaci keramičkih, polimernih i kompozitnih biomaterijala<sup>[195]</sup>

**Tabela 1.3:** Kompozitni materijali kao nosači antibiotika i svojstva postignuta formiranjem kompozita. <sup>[195]</sup>

### III EKSPERIMENTALNI DEO

**Tabela 3.1:** Kalibraciona tabela korišćena u GPC metodi.

**Tabela 3.2:** Indeksiranje parametara i definisanje nivoa citotoksičnosti u difuznom agar testu. <sup>[242]</sup>

### IV REZULTATI

**Tabela 4.1:** Količina klindamicina u materijalima dobijena na osnovu rezultata hromatografije. <sup>[23]</sup>

**Tabela 4.2:** Trake HAp-a, HAp/klindamicina i klindamicina identifikovane u IC spektrima.

**Tabela 4.3:** Srednje vrednosti stereoloških parametara čestica PLGA/HAp/klindamicina sa različitim sadržajem inkapsuliranog antibiotika. <sup>[23]</sup>

**Tabela 4.4:** Rezultati određivanja specifičnih površina, uglova kvašenja i z-potencijala ultrazvučno procesiranih materijala sa i bez inkapsuliranog klindamicina.

**Tabela 4.5:** <sup>1</sup>H NMR rezultati dobijeni za analizu strukture PLGA/HAp kompozita sa i bez inkapsuliranog klindamicina u toku procesa degradacije. <sup>[143]</sup>

**Tabela 4.6:** Rezultati određivanja specifičnih površina PLGA/HAp/klindamicina u toku procesa degradacije.

**Tabela 4.7:** Uglovi kvašenja PLGA/HAp/klindamicina u toku priocesa degradacije.

**Tabela 4.8:** Površinsko naelektrisanje čestica PLGA/HAp/klindamicina u toku procesa degradacije.

**Tabela 4.9:** Srednje vrednosti i standardne devijacije udela preživljavanja MRC-5 i L929 ćelija određene DET metodom nakon inkubacije u toku 24h.

**Tabela 4.10:** Srednje vrednosti i standardne devijacije udela preživljavanja MRC-5 i L929 ćelija određene MTT metodom nakon inkubacije u toku 24h.



## LITERATURA

---

- [1] A. K. Dash, G. C. Cudworth, Therapeutic applications of implantable drug delivery systems, *J. Pharmacol. Toxicol. Method.*, **40** (1998) 1-12.
- [2] N. Sanvicens, M. P. Marco, Multifunctional nanoparticles- properties and prospects for their use in humane medicine, *Cell Press*, **26** (2008) 425-433.
- [3] D. S. Goodsell, *Bionanotechnology: lessons from nature*, Wiley-liss, New Jersey, USA, (2004) 1-10.
- [4] D. F. Williams, On the nature of biomaterials, *Biomaterials*, **30** (2009) 5897-5909.
- [5] Y. Onuki, I. Jacobs, D. Artemov, Y. Kato, Noninvasive visualization of *in vivo* release and intratumoral distribution of surrogate MR contrast agent using the dual MR contrast technique, *Biomaterials*, **31** (2010) 7132-7138.
- [6] N. A. Alymani, M. D. Smith, D. J. Williams, R. D. Petty, Predictive biomarkers for personalised anti-cancer drug use: discovery to clinical implementation, *Europ. J. Cancer*, **46** (2010) 869-879.
- [7] Y. Tian, F. Su, W. Weber, V. Nandakumar, R. Shumway, Y. Jin, X. Zhou, M. R. Holl, R. H. Johnson, D. R. Meldrum, A series of naphthalimide derivatives as intra and extracellular pH sensors, *Biomaterials*, **31** (2010) 7411-7422.
- [8] S. M. Kurtz, J. N. Devine, PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants, *Biomaterials*, **28** (2008) 4845-4869.
- [9] A. W. Lloyd, R. G. A. Faragher, S. P. Denyer, Ocular biomaterials and implants, *Biomaterials*, **22** (2001) 769-785.
- [10] J. Kopeček, Smart and genetically engineered biomaterials and drug delivery systems, *Europ. J. Pharm. Sci.*, **20** (2003) 1-16.
- [11] M. Biondi, F. Ungaro, F. Quaglia, P. A. Netti, Controlled drug delivery in tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60** (2008) 229-242.
- [12] M. Stevanović, N. Ignjatović, B. Jordović, D. Uskoković, Stereological analysis of the poly (*DL*-lactide-co-glycolide) submicron sphere prepared by solvent/non-solvent chemical methods and centrifugal processing *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **18**, **7** (2007) 1339-1344.

- [13] I. Jovanović, B. Jordović, M. Petković, N. Ignjatović, D. Uskoković, Preparation of smallest microparticles of poly-*D,L*-lactide by modified precipitation method: Influence of the process parameters, *Microscop. Res. Techniq.*, **71** (2007) 86-92.
- [14] N. Ignjatović, C. Liu, J. Czernuszka, D. Uskoković, Micro and nano/injectable composite biomaterials containing calcium phosphate coated with poly(*dl*-lactide-co-glycolide), *Acta Biomater.*, **3** (2007) 927-935.
- [15] M. Jevtić, M. Mitrić, S. Škapin, B. Jančar, N. Ignjatović, D. Uskoković, Crystal structure of hydroxyapatite nano-rods synthesized by sonochemical homogenous precipitation, *Cryst. Grow. Des.*, **8** (2008) 2217 - 2222.
- [16] M. Jevtić, A. Radulović, N. Ignjatović, M. Mitrić, D. Uskoković, Controlled assembly of poly(*D,L*-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanospheres under ultrasonic irradiation, *Acta Biomaterialia*, **5** (2009) 208-218.
- [17] Z. Ajduković, N. Ignjatović, D. Petrović, D. Uskoković, Substitution of osteoporotic alveolar bone by biphasic calciumphosphate/poly-*DL*-Lactide-co-glycolide biomaterials, *J. Biomater. Appl.*, **21** (2007) 317-328.
- [18] Z. Ajduković, S. Najman, V. Savić, D. Mihailović, D. Uskoković, N. Ignjatović, Lj. Đorđević, Repair of bone tissue affected by osteoporosis with hydroxyapatite/poly-*l*-lactide (HAp-PLLA) with and without blood plasma, *J. Biomater. Appl.*, **20** (2005) 179-190.
- [19] M. M. Stevanović, D. P. Uskoković, Poly(lactide-co-glycolide)-based micro and nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamins, *Curr. Nanosci.*, **5** (2009) 1-14.
- [20] M. Stevanović, A. Radulović, B. Jordović, D. Uskoković, Poly(*DL*-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **4** (2008) 349-358.
- [21] M. M. Stevanović, B. Jordović, D. P. Uskoković, Morphological changes of poly(*DL*-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid during *in vitro* degradation process, *J. Microscopy*, **232** (2008) 511-516.
- [22] I. Mitranić, M. Stevanović, B. Nedeljković, N. Ignjatović, D. Uskoković, Controllable synthesis of horseradish peroxidase loaded poly(*D,L*-lactide) nanospheres, *J. Bionanosci.*, **3** (2009) 22-32.
- [23] M. Vukomanović, S. D. Škapin, B. Jančar, T. Maksin, N. Ignjatović, V. Uskoković, D. Uskoković, Poly(*D,L*-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanospheres. Part 1: a multifunctional system for controlled drug delivery, *Colloid Surf. B*, **82** (2011) 404-413.

- [24] N.L. Ignjatović, P. Ninkov, R. Sabetrasekh, D.P. Uskoković, A novel nano drug delivery system based on tigeacycline-loaded calciumphosphate coated with poly-DL-lactide-co-glycolide, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **21** (2010) 231-239.
- [25] M. Vukomanović, M. Mitrić, S.D. Škapin, E. Žagar, J. Plavec, N. Ignjatović, D. Uskoković, Influence of ultrasonic processing on the macromolecular properties of poly (*D,L*-lactide-co-glycolide) alone and in its biocomposite with hydroxyapatite, *Ultrason. Sonochem.*, **17** (2010) 902-908.
- [26] M. Jevtić, Sonohemijska sinteza i karakterizacija hidroksiapatita (HAp) i poli(*D,L*-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit (DLPLG/HAp) kompozita, *Magistarska teza, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu*, (2008).
- [27] W. H. Suh, Y.-H. Suh, G. D. Stucky, Multifunctional systems at the interface of physical and life sciences, *Nano Today*, **4** (2009) 27-36.
- [28] M. Veerapandian, K. Yun, The state of the art in biomaterials as nanobiopharmaceuticals, *Dig. J. Nanomater. Bios.*, **4** (2009) 243.-262.
- [29] K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, K. M. Shakesheff, Polymeric systems for controlled drug delivery, *Chem. Rev.*, **99** (1999) 3181-3198.
- [30] A. Hatefi, B. Amsden, Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems, *J. Control. Release*, **80** (2002) 9-28.
- [31] A. Basarkar, J. Singh, Poly(*D,L*-lactide-co-glycolide)-polymethacrylate nanoparticles for intramuscular delivery of plasmid encoding interleukin-10 to prevent autoimmune diabetes in mice, *Pharm. Res.*, **26** (2008) 72-81.
- [32] J. P. K. Tan, S. H. Kim, F. Nederberg, E. A. Apple, R. M. Waymouth, Y. Zhang, J. L. Hedrick, Y. Y. Yang, Hierarchical supermolecular structures for sustained drug release, *Small*, **5** (2009) 1504-1507.
- [33] E. Briones, C. I. Colino, J. M. Lanao, Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells, *J. Control. Release*, **125** (2008) 210-227.
- [34] J. H. Park, G. Saravanakumar, K. Kim, I. C. Kwon, Target drug delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **62** (2010) 28-41.
- [35] J. Prakash, E. de Jong, E. Post, A. S. H. Gouw, L. Beljaars, K. Poelstra, A novel approach to deliver anticancer drugs to key cell types in tumors using a PDGF receptor-binding cyclic peptide containing carrier, *J. Control. Release*, **145** (2010) 91-101.

- [36] S. H. Kim, J. H. Jeong, K. W. Chun, R. T. G. Park, Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysone)-poly(ethylene-glycol)-folate conjugate, *Langmuir*, **21** (2005) 8852-8857.
- [37] M. Ferrari, Frontiers in cancer nanomedicine: Directing mass transport through biological barriers, *Trends Biotechnol.*, **28(4)** (2010) 181-188.
- [38] J. Folkman, D. M. Long, The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy, *J. Surg. Res.*, **4** (1964) 139-142.
- [39] L. Y. Qiu, Y. H. Bae, Polymer architecture and drug delivery, *Pharm. Res.* **23** (2006) 1-30.
- [40] G. E. Marchant, Small is beautiful: What can nanotechnology do for personalized medicine?, *Curr. Pharmacogen. Pers. Med.*, **7** (2009) 231-237.
- [41] A. Surendiran, S. Sandhiya, S. C. Pradhan, C. Adithan, Novel applications of nanotechnology in medicine, *Indian J. Med. Res.*, **130** (2009) 689-701.
- [42] N. Doshi, S. Mitragotri, Designer biomaterials for nanomedicine, *Adv. Funct. Mater.*, **19** (2009) 3843-3854.
- [43] L. Zhang, T. J. Webster, Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration, *Nano Today*, **4** (2009) 66-80.
- [44] E. J. Harvey, J. E. Henderson, S. T. Vengallatore, Nanotechnology and bone healing, *J. Ortho. Trauma*, **24** (2010) S25-S30.
- [45] S. Huang, X. Fu, Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration, *J. Control. Release*, **142(2)** (2010) 149-159.
- [46] M. Jahanshahi, Z. Babaei, Protein nanoparticle: a unique system as drug delivery vehicles, *African J. Biotech.*, **7 (26)** (2008) 4926-4934.
- [47] A. J. Varma, J. F. Kennedy, P. Galgali, Synthetic polymers functionalized by carbohydrates: a review, *Carbohydr. Polym.*, **56** (2004) 429-445.
- [48] F. Kratz, U. Beyer, Serum proteins as drug carriers of anticancer agents: a review, *Drug Deliv.*, **5(4)** (1998) 281-299.
- [49] P. K. Vemula, G. A. Cruikshank, J. M. Karp, M. G. John, Self-assembled prodrugs: as enzymatically triggered drug-delivery platform, *Biomaterials*, **30** (2009) 383-393.
- [50] F. Pierige, L. Rossi, M. Magnani, Cell-based drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60** (2008) 286-295.

- [51] M. Magnani, L. Rossi, A. Fraternali, M. Bianchi, A. Antonelli, R. Crinelli, L. Chiarantini, Erythrocyte-mediated delivery of drugs, peptides and modified oligonucleotides, *Gene Ther.*, **9** (2002) 749-751.
- [52] C. G. Millan, M. L. S. Marinero, A. Z. Castaneda, J. M. Lanao, Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers, *J. Control. Release*, **95** (2004) 27-49.
- [53] M. T. Novak, J. D. Bryers, W. M. Reichert, Biomimetic strategies based on viruses and bacteria for the development of immune evasive biomaterials, *Biomaterials*, **30** (2009) 1989-2005.
- [54] S. Paukner, G. Kohl, W. Lubitz, Bacterial ghosts as novel advanced drug delivery systems: antiproliferative activity of loaded doxorubicin in human Caco-2 cells, *J. Control. Release*, **94** (1) (2004) 63-74.
- [55] A. Rubinstein, Microbially controlled drug delivery to the colon, *Biopharm. Drug Dispos.*, **11** (1990) 465-475.
- [56] J. Bradbury, Designing bacteria and white cells to deliver drugs to the gut, *Lancet*, **362** (2003) 964-965.
- [57] X. Zhang, W. T. Godbey, Viral vectors for gene delivery in tissue engineering, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **58** (2006) 515-534.
- [58] E. Callaway, A. Coghlan, Synthetic life: where next?, *New Sci.*, **206** (2010) 6-8.
- [59] R. E. Serda, A. Mack, M. Pulikkathara, A. M. Zasko, C. Chiappini, J. R. Fakhoury, D. Webb, B. Godin, J. L. Conyers, J. Bankson, X. W. Liu, J. A. Bankson, M. Ferrari, Cellular association and assembly of amultistage delivery system, *Small*, **6**(12) (2010)1329-1340.
- [60] C. Wischke, A. Lendlein, Shape-memory polymers as drug carriers- a multifunctional system, *Pharm. Res.*, **27** (2010) 527-529.
- [61] G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, B. Zebli, T. Liedl, A. G. Skirtach, K. Kohler, A. A. Antipov, N. Gaponik, A. S. Susha, M. Winterhalter, W. J. Parak, Nanoengineered polymer capsules: tools for detection, controlled delivery, and site-specific manipulation, *Small*, **1** (2005) 194-200.
- [62] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int. J. Pharm.*, **385** (2010) 113-142.
- [63] B. Sun, B. Ranganathan, S.-S. Feng, Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for target chemotherapy of breast cancer, *Biomaterials*, **29** (2008) 475-486.

- [64] L. Sun, Y. Zang, M. Sun, H. Wang, X. Zhu, S. Xu, Q. Yang, Y. Li, Y. Shan, Synthesis of magnetic and fluorescent multifunctional hollow silica nanocomposites for live cell imaging, *J. Colloid Inter. Sci.*, **350** (2010) 90-98.
- [65] S. Singh, K. Bozhilov, A. Mulchandani, N. Myung, W. Chen, Biologically programmed synthesis of core-shell CdSe/ZnS nanocrystals, *Chem. Commun.*, **46** (2010) 1473-1475.
- [66] V. Torchilin, Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **71** (2009) 431-444.
- [67] A. S. De Dios, M. E. Diaz-Garcia, Multifunctional nanoparticles: analytical prospects, *Anal. Chim. Acta*, **666** (2010) 1-22.
- [68] H. De Martimprey, J.-R. Bertrand, C. Malvy, P. Couvreur, C. Vauthier, New core-shell nanoparticles for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma, *Pharm. Res.*, **27(3)** (2010) 498-509.
- [69] S.-H. Hu, S.-Y. Chen, D.-M. Liu, C.-S. Hsiao, Core/single-crystal-shell nanospheres for controlled drug release via a magnetically triggered rupturing, *Adv. Mater.*, **20** (2008) 2690-2695.
- [70] V. P. Torchilin, Multifunctional nanocarriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58** (2006) 1532-1555.
- [71] S. Utech, C. Scherer, M. Maskos, Multifunctional, multicompartiment polyorganosiloxane magnetic nanoparticles for biomedical applications, *J. Magn. Magn. Mater.*, **321** (2009) 1386-1388.
- [72] I. Garcia, M. Marradi, S. Penades, Glyconanoparticles: multifunctional nanomaterials for biomedical applications, *Nanomed.*, **5** (2010) 777-792.
- [73] S. Fischer, C. Foerg, S. Ellenberger, H. P. Merkle, B. Gander, One-step preparation of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles and their functionalization with model ligands, *J. Control. Release*, **111** (2006) 135-144.
- [74] E. Karathanasis, L. Chan, S. R. Balusu, C. J. Dorsi, A. V. Annapragada, I. Sechopoulos, R. V. Bellamkonda, Multifunctional nanocarriers for mammographic quantification of tumor dosing and prognosis of breast cancer therapy, *Biomaterials*, **29** (2008) 4815-4822.
- [75] S. Bhaskar, K. M. Pollock, M. Yoshida, J. Lahann, Towards designer microparticles: simultaneous control of anisotropy, shape, and size, *Small*, **6** (2009) 404-411.
- [76] N. Sounderya, Y. Zhang, Use of core/shell structured nanoparticles for biomedical applications, *Recent Pat. Biomed. Eng.*, **1** (2008) 34-42.

- [77] X. Gong, S. Peng, W. Wen, P. Sheng, W. Li, Design and fabrication of magnetically functionalized core/shell microspheres for smart drug delivery, *Adv. Funct. Mater.*, **19** (2009) 292-297.
- [78] G. Rethore, A. Pandit, Use of templates to fabricate nanoscale spherical structures for defined architectural control, *Small*, **22** (2010) 488-498.
- [79] Q. Xu, M. Hashimoto, T. T. Dang, T. Hoare, D. S. Kohane, G. M. Whitesides, R. Langer, D. G. Anderson, Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery, *Small*, **5** (2009) 1575-1581.
- [80] W. Ulbrich, A. Lamprecht, Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases, *J. R. Soc. Interface*, **7** (2010) S55-S66.
- [81] J. A. Champion, Y. K. Katare, S. Mitragotri, Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers, *J. Control. Release*, **121** (2007) 3-9.
- [82] Y. D. Yin, Y.N. Xia, Self-assembly of monodispersed spherical colloids into complex aggregates with well-defined sizes, shapes, and structures, *Adv. Mater.*, **13** (4) (2001) 267-271.
- [83] V.N. Manoharan, M.T. Elsesser, D.J. Pine, Dense packing and symmetry in small clusters of microspheres, *Science*, **301** (2003) 483-487.
- [84] C.C. Ho, A. Keller, J.A. Odell, R.H. Ottewill, Preparation of monodisperse ellipsoidal polystyrene particles, *Colloid Polym. Sci.*, **271** (5) (1993) 469-479.
- [85] H. Ahrens, K. Graf, C. A. Helm, Metallodielectric colloidal core-shell particles for photonic applications, *Langmuir*, **17** (11) (2001) 3113-3115.
- [86] D. Dendukuri, K. Tsoi, T.A. Hatton, P.S. Doyle, Controlled synthesis of nonspherical microparticles using microfluidics, *Langmuir*, **21** (6) (2005) 2113-2116.
- [87] O.D. Velev, A.M. Lenhoff, E.W. Kaler, A class of microstructured particles through colloidal crystallization, *Science*, **287** (2000) 2240-2243.
- [88] P. Sozzani, S. Bracco, A. Comotti, R. Simonutti, P. Valsesia, Y. Sakamoto, O. Terasaki, Complete shape retention in the transformation of silica to polymer micro-objects, *Nat. Mater.*, **5** (7) (2006) 545-551.
- [89] S.Q. Xu, Z.H. Nie, M. Seo, P. Lewis, E. Kumacheva, H.A. Stone, P. Garstecki, D.B. Weibel, I. Gitlin, G.M. Whitesides, Generation of monodisperse particles by using microfluidics: control over size, shape, and composition, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **44** (5) (2005) 724-728.

- [90] J.A. Champion, S. Mitragotri, Role of target geometry in phagocytosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103** (2006) 4930–4934.
- [91] D. Dendukuri, D.C. Pregibon, J. Collins, T.A. Hatton, P.S. Doyle, Continuous-flow lithography for high-throughput microparticle synthesis, *Nat. Mater.*, **5** (2006) 365–369.
- [92] J.P. Rolland, B.W. Maynor, L.E. Euliss, A.E. Exner, G.M. Denison, J.M. DeSimone, Direct fabrication and harvesting of monodisperse, shape-specific nanobiomaterials, *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (2005) 10096–10100.
- [93] U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues, *AAPS PharmSciTech*, **6** (2005) E594-E604.
- [94] T. Phromsopha, Y. Baimark, Chitosan microparticles prepared by the water-in-oil emulsion solvent diffusion method for drug delivery, *Biotech.*, **9** (2010) 61-66.
- [95] V. Uskoković, M. Drofenik, Reverse micelles: Inert nano-reactors or physico-chemically active guides of the capped reactions, *Adv. Colloid. Interface Sci.*, **133** (2007) 23-34.
- [96] S. K. Dondapati, P. Lozano-Sanchez, I. Katakis, Controlled electrophoretic deposition of multifunctional nanomodules for bioelectrochemical applications, *Biosen. Bioelectron.*, **24** (2008) 55-59.
- [97] J. H. Bang, K. S. Suslick, Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials, *Adv. Mater.*, **22** (2010) 1-22.
- [98] K. Landfester, A. Musyanovych, V. Mailander, From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using microemulsion process, *J. Polymer Sci.*, **48** (2010) 493-515.
- [99] S. J. Son, X. Bai, A. Nan, H. Ghandehari, S. B. Lee, Template synthesis of multifunctional nanotubes for controlled release, *J. Control. Release*, **114** (2006) 143-152.
- [100] J. L. D. Pozo, R. Patel, Infections associated with prosthetic joints, *N. Engl. Med.*, **361** (8) (2009) 787-794.
- [101] G. Cierny, D. Di Pasquale, Treatment of chronic infection, *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, **14** (2006) S105-S110.
- [102] L. S. Levin (Ed.), Infection following open fractures, In: Complications in orthopaedics: Open fractures, Chapter 7, *Am. Acad. Orthop. Surg.*, (2009) 73-87.
- [103] D. P. Lew, F. A. Waldvogel, Osteomyelitis, *Lancet*, **364** (2004) 369-379.
- [104] G. Cierny, J. T. Mader, J. J. Penninck, A clinical staging for adult osteomyelitis, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **414** (2003) 7-14.



- [105] D. L. Goldenberg, Septic arthritis, *Lancet*, **351** (1998) 197-202.
- [106] C. W. Fink, J. D. Nelson, Septic arthritis and osteomyelitis in children, *Clin. Rheum. Dis.*, **12 (2)** (1986) 423-435.
- [107] P. A. Ostermann, S. L. Henry, D. Seligson, The role of local antibiotic therapy in the management of compound fractures, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **295** (1993) 102-111.
- [108] P. A. Ostermann, S. L. Henry, D. Seligson, Timing of wound closure in severe compound fractures, *Orthopedics*, **17(5)** (1994) 397-399.
- [109] W. J. Leach, N. I. Wilson, Trends in infection prophylaxis in orthopaedics, *J. R. Coll. Surg. Edinb.*, **37 (4)** (1992) 265-266.
- [110] M. Zilberman, J. J. Elsner, Antibiotic-eluting medical devices for various applications, *J. Control. Release*, **130** (2008) 202-215.
- [111] K. L. Garvin, J. A. Miyano, D. Robinson, D. Giger, J. Novak, S. Radio, Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model, *J. Bone Joint Surg.*, **76** (1994) 1500-1506.
- [112] C. R. Perry, J. K. Ritterbusch, S. H. Rice, K. Davenport, R. E. Burdge, Antibiotics delivered by an implantable drug pump: a new application for treating osteomyelitis, *Am. J. Med.*, **80** (1986) 222-227.
- [113] W. A. Jiranek, A. D. Hanssen, A. S. Greenwald, Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement, *J. Bone Joint Surg.*, **88** (2006) 2487-2500.
- [114] J. M. Maloney, J. T. Santini, Implantable microchips for controlled drug delivery, *Proc. 26th Annu. Int. Conf. IEEE EMBS*, (2004) 2668-2673
- [115] M. C. Branco, J. P. Schneider, Self-assembling materials for therapeutic delivery, *Acta Biomater.*, **5** (2009) 817-831.
- [116] J. G. E. Hendriks, J. R. van Horn, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, Background of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infections, *Biomaterials*, **25** (2004) 545-556.
- [117] H. van de Belt, D. Neut, J. R. van Horn, H. C. van der Mei, W. Schenk, H. J. Busscher, Antibiotic resistance- to treat... or not to treat?, *Nat. Med.*, **5** (1999) 358-359.
- [118] Q. Xu, J. T. Czernuszka, J. Controlled release of amoxicillin from hydroxyapatite-coated poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres, *J. Control. Release*, **127** (2008) 146-153.

- [119] M. R. Virto, B. Elorza, S. Torrado, Md. L.A. Elorza, G. Frutos, Improvement of gentamicin poly(*D,L*-lactic-co-glycolic acid) microspheres for treatment of osteomyelitis induced by orthopedic procedures, *Biomaterials*, **28** (2007) 877-885.
- [120] J. S. Price, A. F. Tencer, D. M. Arm, G. A. Bohach, Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **30** (1998) 281-286.
- [121] G. Lewis, S. Janna, A. Bhattaram, Influence of the method of blending an antibiotic powder with an acrylic bone cement on physical, mechanical, and thermal properties of the cured cement, *Biomaterials*, **26** (2005) 4317-4325.
- [122] Z. Wachol-Drewek, M. Pfeiffer, E. Scholl, Comparative investigations of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin, *Biomaterials*, **17** (1996) 1733-1738.
- [123] C. G. Ambrose, G. R. Gogola, T. A. Clyburn, A. K. Raymond, A. S. Peng, A. G. Mikos, Antibiotic microspheres: preliminary testings for potential treatment of osteomyelitis, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **415** (2003) 279-285.
- [124] L. H. Calhoun, J. T. Mader, Biodegradable antibiotic implants and methods of their use in treating and preventing infections, (1993) *US Patent No. 5268178*.
- [125] C. S. Adams, V. Antoci, G. Harrison, P. Patal, T. A. Freeman, I. M. Shapiro, J. Parvizi, N. J. Hickok, S. Radin, P. Ducheyne, Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on implant surfaces successfully controls osteomyelitis, *J. Orthop. Res.*, **27(6)** (2007) 701-709.
- [126] S. A. Jenkins, G. Liversidge, Controlled release compositions comprising a cephalosporin for the treatment of a bacterial infection, (2008) *USPTO Patent App. 20080069870*.
- [127] S. K. Nandi, B. Kundu, S. K. Ghosh, T. K. Mandal, S. Datta, D. K. De, D. Basu, Cefuroxime-impregnated calcium phosphates as an implantable delivery system in experimental osteomyelitis, *Ceram. Int.*, **35** (2009) 1367-1376.
- [128] M. Al-Maiyah, D. Hill, A. Bajwa, S. Slater, P. Patil, A. Port, P. J. Gregg, Bacterial contaminants and antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty, *J. Bone Joint. Surg. Br.*, **87** (2005) 1256-1258.
- [129] R. E. Lewis, M. E. Klepser, E. J. Ernst, B. C. Lund, D. J. Biedenbach, R. N. Jones, Evaluation of low-dose, extended-interval clindamycin regimens against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* using dynamic *in vitro* model of infection, *Am. Soc. Microbiol.*, **43** (1999) 2005-2009.
- [130] H. B. Arnardottir, S. J. Sveinsson, T. Kristmundsdottir, The release of clindamycin phosphate from a suspension of different types of liposomes and selected topical dosages forms, *Int. J. Pharm.*, **134** (1996) 71-77.

- [131] J. A. Halliday, D. A. Carr, L. Boyd, M. Macgregor, A. Thom, L. Kelly, M.A. Livingstone, L. M. Currie, Drug delivery polymer with hydrochloride salt of clindamycin, (2008) *WO/2008/007098*.
- [132] A. Bryskier (Ed.), Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals, *ASM Press, Washington, USA*, 2005.
- [133] S. Budavari (Ed.), The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, *11th ed., Merck&Co, Rahway, New Jersey, USA*, 1989.
- [134] W. Ren, R. Zhang, M. Hawkins, T. Shi, D. C. Markel, Efficacy of periprosthetic erythromycin delivery for wear debris-induced inflammation and osteolysis, *Inflamm. Res.*, (2010) doi.10.1007/s00011-010-0229-x.
- [135] P. Wu, D. W. Grainger, Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, *Biomaterials*, **27** (2006) 2450-2467.
- [136] V. C. A. Martins, G. Goissis, A. C. Ribeiro, Jr. E. Marcoantonio, M. R. Bet, The controlled release of antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites, *Artif. Organ.*, **22(3)** (1998) 215-221.
- [137] K. Kanellakopoulou, M. Kolia, A. Anastasiadis, T. Korakis, E. J. Giamarellos-Bourboulis, A. Andreopoulos, E. Dounis, H. Giamarellou, Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluoroquinolones: a *in vitro* study, *Antimicrob. Agent. Chemother.*, **43** (1999) 714-716.
- [138] W. Wu, Q. Zheng, X. Guo, J. Sun, Y. Liu, A programmed release multi-drug implant fabricated by three-dimensional printing technology for bone tuberculosis therapy, *Biomed. Mater.*, **4** (2009) 1-10.
- [139] S. P. Victor, T. S. S. Kumar, Tailoring calcium-deficient hydroxyapatite nanocarriers for enhanced release of antibiotics, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **4** (2008) 203-209.
- [140] O. I. Corrigan, X. Li, Quantifying drug release from PLGA nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **37** (2009) 477-485.
- [141] C. Berklund, K. K. Kim, D. W. Pack, PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors, *Pharm. Res.*, **20** (2003) 1055-1062.
- [142] J. Siepmann, K. Elkharraz, F. Siepmann, D. Klose, How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microspheres: a quantitative treatment, *Biomacromolecul.*, **6** (2005) 2312-2319.
- [143] M. Vukomanović, S. D. Škapin, I. Poljanšek, E. Žagar, B. Kralj, N. Ignjatović, D. Uskoković, Poly(*D,L*-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanosphere. Part 2: Simultaneous release of of a drug and a prodrug (clindmycin and clindamycin phosphate), *Colloid. Surf. B.*, **82** (2011) 414-421.
- [144] X. Huang, C. S. Brazel, On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery system, *J. Control. Release*, **73** (2001) 121-136.

- [145] B. Narasimhan, R. Langer, Zero order release of of micro- and macromolecules from polymeric devices: the role of the burst effect, *J. Control. Release*, **47** (1997) 13-20.
- [146] M. Stevanović, J. Savić, B. Jordović, D. Uskoković, Fabrication, *in vitro* degradation and the release behaviours of poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid, *Colloid. Surface Biointerf.*, **59** (2007) 215-223.
- [147] J. Z. Gilad, R. Teles, M. Goodson, R. R. White, P. Stashenko, Development of a clindamycin-impregnated fiber as an intracanal medication in endodontic therapy, *J. Endodnt.*, **25 (11)** (1999) 722-727.
- [148] M. Abdennour, P. Stashenko, M. Scrima, J. Gilad, M. Goodson, Characterization of an antibiotic impregnated delivery system as an intracanal medicament in endodontic therapy, (2008) *US Patent No. 7331787*.
- [149] A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloid. Surf. Biointerf.*, **75** (2010) 1-18.
- [150] G. Khang, H.-S. Choi, J. M. Rhee, Controlled release of gentamicin sulphate from poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) wafers for the treatment of osteomyelitis, *Korea Polymer J.*, **8** (2000) 253-260.
- [151] S. P. Noel, H. Courtney, J. D. Bumgardner, W. O. Haggard, Chitosan films, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **466** (2008) 1377-1382.
- [152] K. Kanellakopoulou, E. J. Giamarellos-Bourboulis, Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections, *Drugs*, **59** (2000) 1223-1232.
- [153] J. S. Temenoff, F. K. Kasper, A. G. Mikos, Fumarate-based macromers as scaffolds for tissue engineering applications, In: Topics in tissue engineering, R. Reis, E. Chiellini (Eds.), *Vol 3, Chapter 5*, (2007), [http://www.oulu.fi/spareparts/ebook\\_topics\\_in\\_t\\_e\\_vol3/published\\_chapters.html](http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol3/published_chapters.html).
- [154] T. N. Gerhart, R. D. Roux, G. Horowitz, R. L. Miller, P. Hanff, W. C. Hayes, Antibiotic release from an experimental biodegradable bone cement, *J. Orthop. Res.*, **6(4)** (1988) 585-592.
- [155] T. N. Gergart, C. T. Laurencin, A. J. Domb, R. S. Langer, W. C. Hayes, Biodegradable polymers for drug delivery in bone, (1994) *USA Patent No. 5286763*.
- [156] D. Neut, O. S. Kluin, B. J. Crielaard, H. C. Van der Mei, H. J. Busscher, D. W. Grijpma, A biodegradable antibiotic delivery system based on poly(trimethylene carbonate) for the treatment of osteomyelitis, *Acta Orthop.*, **80(5)** (2009) 514-519.
- [157] B. Rutledge, D. Huyette, D. Day, J. Anglen, Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **411** (2003) 280-287.

- [158] F.-L. Mi, S.-S. Shyu, Y.-M. Lin, K. Park, PLGA-PEG block copolymers for drug formulations, *Drug Deliv. Technol.*, **3(5)** (2003) 44-49.
- [159] B. Wildemann, A. Sander, P. Schwabe, M. Lucke, U. Stockle, M. Raschke, N. P. Haas, G. Schmidmaier, Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(*D,L*-lactide-co-glycolide)-growth factor coating for orthopedic devices, *Biomaterials*, **26(18)** (2005) 4035-4040.
- [160] R. O. Darouiche, J. Farmer, C. Chaput, M. Mansouri, G. Saleh, G. C. Landon, Anti-infective efficacy of antiseptic-coated intermedullary nails, *J. Bone Joint Surg. Am.*, **80** (1998) 1336-1340.
- [161] S.-J. Liu, S. W.-N. Ueng, S.-S. Lin, E.-C. Chan, *In vivo* release of vancomycin from biodegradable beads, *J. Biomed. Mater. Res.*, **63 (6)** (2002) 807-813.
- [162] M. Baro, E. Sanchez, A. Delgado, A. Perera, C. Evora, *In vitro-in vivo* characterization of gentamicin bone implants, *J. Control. Release*, **83(3)** (2002) 353-364.
- [163] E. Vey, C. Roger, L. Meehan, J. Booth, M. Claybourn, A. F. Miller, A. Saiani, Degradation mechanism of poly(*D,L*-lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution, *Polymer Degrad. Stab.*, **93** (2008) 1869-1876.
- [164] A. G. Ding, A. Shenderova, S. P. Schwendeman, Prediction of microclimate pH in poly(*D,L*-lactide-co-glycolide) films, *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2008) 5384-5390.
- [165] J. H. Jung, M. Ree, H. Kim, Acid- and base-catalyzed hydrolysis of aliphatic polycarbonates and polyesters, *Cat. Today*, **115** (2006) 283-287.
- [166] O. M. Bostman, Osteotic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants, *J. Bone Joint Surg.*, **73 (4)** (1991) 679-682.
- [167] O. Bostman, E. Hirvensalo, J. Mikinen, P. Rokkanen, Foreign-body reaction to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers, *J. Bone Joint Surg.*, **72 (4)** (1990) 592-596.
- [168] P. A. Gunatillake, R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *Eur. Cel. Mater.*, **5** (2003) 1-16.
- [169] J. Kang, S. P. Schwendeman, Comparison of the effects of Mg(OH)<sub>2</sub> and sucrose on the stability of bovine serum albumin encapsulated in injectable poly(*D,L*-lactide-co-glycolide) implants, *Biomaterials*, **23** (2002) 239-245.
- [170] T. Paragkumar, D. Edith, J.-C. Six, Surface characteristics of PLA and PLGA films, *Appl. Surf. Sci.*, **253** (2006) 2758-2764.

- [171] X. H. Wang, D. P. Li, W. J. Wang, Q. L. Feng, F. Z. Cui, Y. X. Xu, X. H. Song, Covalent immobilization of chitosan and heparin on PLGA surface, *Int. J. Biolog. Macromolec.*, **33** (2003) 95-100.
- [172] M. Muller, J. Voros, G. Csucs, E. Walter, G. Danuser, H. P. Merkle, N. D. Spencer, M. Textor, Surface modification of PLGA microspheres, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **66** (2003) 55-61.
- [173] Y. Y. Huang, T. W. Chung, Microencapsulation of gentamicin in biodegradable PLA and/or PLA/PEG copolymer, *J. Microencapsul.*, **18(4)** (2001) 457-465.
- [174] M. R. Rauschmann, T. A. Wichelhaus, V. Stirnal, E. Dingeldein, L. Zichner, R. Schnettler, V. Alt, Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections, *Biomaterials*, **26** (2005) 2677-2684.
- [175] C. L. Nelson, S. G. McLaren, R. A. Skinner, M. S. Smeltzer, J. R. Thomes, K. M. Olsen, The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulfate tobramycin pellets, *J. Orthop. Res.*, **20** (2002) 643-647.
- [176] N. D. Webb, J. D. McCanless, H. S. Courtney, J. D. Bumgardner, W. O. Haggard, Daptomycin eluted from calcium sulfate appears effective against Staphylococcus, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **466** (2008) 1383-1387.
- [177] W. G. Billotte, Ceramic biomaterials, In: The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition, Chapter 38, Ed. J. D. Bronzino, Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.
- [178] S. K. Nandi, P. Mukherjee, S. Roy, B. Kundu, D. K. De, D. Basu, Local antibiotic delivery system for the treatment of osteomyelitis- a review, *Mater. Sci. Eng. C*, **29** (2009) 2478-2485.
- [179] K. Kawanabe, Y. Okada, Y. Matsusue, H. Iida Nakamura, Treatment of osteomyelitis with antibiotic-soaked porous glass ceramic, *J. Bone Joint Surg.*, **80** (1998) 527-530.
- [180] J. C. Lambotte, H. Thomazeau, G. Cathelineau, G. Lancien, J. Minet, F. Langlais, Tricalcium phosphate an antibiotic carrier: a study focused on experimental osteomyelitis in rabbits, *Chirurgie.*, **123** (1998) 572-579.
- [181] Y. Yamamshita, A. Uchida, T. Yamakawa, Y. Shinto, N. Araki, K. Kato, Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic, *Int. Orthop.* **22** (1998) 247-251.
- [182] T. A. Ostomel, Q. Shi, C. K. Tsung, H. Liang, G. D. Stucky, Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity, *Small*, **2** (2006) 1261-1265.
- [183] S. V. Dorozhkin, Bioceramics of calcium orthophosphates, *Biomaterials*, **31** (2010) 1465-1485.

- [184] E. Verron, I. Khairoun, J. Guicheux, J.-M. Bouler, Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review, *Drug Deliv. Today*, **15** (2010) 547-552.
- [185] V. Uskoković, D. Uskoković, Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents, *J. Biomed. Mater. Res.*, (2010) DOI: 10.1002/jbm.b.31746.
- [186] Y. Shinto, A. Uchida, F. Korkusuz, N. Araki, K. Ono, Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics, *J. Bone Joint Surg.*, **74** (1992) 600-604.
- [187] M. Itokazu, W. Yang, T. Aoki, A. Ohara, N. Kato, Synthesis of antibiotic-loaded interporous hydroxyapatite blocks by vacuum method and *in vitro* drug release testing, *Biomaterials*, **19** (1998) 817-819.
- [188] M. E. Shirtliff, J. H. Calhoun, J. T. Mader, Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic impregnated hydroxyapatite, *Clin. Orthop.*, **401** (1997) 239-247.
- [189] T. Saito, R. Takeuchi, K. Hirakawa, N. Nagata, T. Yoshida, T. Kashino, K. Okuda, M. Takema, T. Hori, Slow-releasing potential of vancomycin-loaded porous hydroxyapatite blocks implanted into MRSA osteomyelitis, *J. Biomed. Mater. Res.*, **63** (2002) 245-251.
- [190] M. Itokazu, T. Ohno, T. Tanemori, E. Wada, N. Kato, K. Watanabe, Antibiotic-loaded hydroxyapatite blocks in the treatment of experimental osteomyelitis in rats, *J. Med. Microbiol.*, **46** (1997) 779-783.
- [191] A. Sudo, Treatment of infected hip arthroplasty with antibiotic-impregnated calcium-hydroxyapatite, *J. Arthroplasty*, **23** (2008) 145-150.
- [192] J. K. Koort, T. J. Makinen, E. Suokas, M. Vieranto, J. Jalava, J. Knuuti, P. Tormala, H. T. Aro, Efficacy of ciprofloxacin-releasing bioabsorbable osteoconductive bone defect filler for treatment of experimental osteomyelitis due to staphylococcus aureus, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49** (2005) 1502-1508.
- [193] S. Bodhak, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Electrically polarized HAp-coated Ti: *in vitro* bone cell-material interactions, *Acta Biomater.*, **6** (2010) 641-651.
- [194] S. Bodhak, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Role of surface charge and wettability on early stage mineralization and bone cell-materials interactions of polarized hydroxyapatite, *Acta Biomater.*, **5** (2009) 2178-2188.
- [195] V. Mourino, A. R. Boccaccini, Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds, *J. R. Soc. Interface*, **7** (2010) 209-227.
- [196] L. Chen, H. Wang, J. Wang, M. Chen, L. Shang, Ofloxacin-delivery system of polyanhydride and polylactide blend used in the treatment of bone infection, *J. Biomed. Mater. Res. B*, **83 B** (2007) 589-595.

- [197] V. Luginbuehl, K. Ruffieux, C. Hess, D. Reichardt, B. Von Rechenberg, K. Nuss, Controlled release of tetracycline from biodegradable  $\beta$ -tricalcium phosphate composites, *J. Biomed. Mater. Res. B*, **92B** (2010) 341-352.
- [198] C. Schiller, M. Epple, Carbonated calcium phosphate are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters, *Biomaterials*, **24** (2003) 2037-2043.
- [199] Z. Yang, S. M. Best, R. E. Cameron, The influence of alpha-tricalcium phosphate nanoparticles and microparticles on the degradation of poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide), *Adv. Mater.*, **21** (2009) 3900-3904.
- [200] M. L. Ho, Y. C. Fu, G. J. Wang, H. T. Chen, J. K. Chang, T. H. Tsai, C. K. Wang, Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite, *J. Control. Release*, **128** (2008) 142-148.
- [201] J. B. Lee, S. H. Lee, S. M. Yu, J.-C. Park, J. B. Choi, J. K. Kim, PLGA scaffold incorporated with hydroxyapatite for cartilage regeneration, *Surf. Coat. Technol.*, **202** (2008) 5757-5761.
- [202] M. Vukomanović, I. Šarčev, B. Petronijević, S. D. Škapin, N. Ignjatović, D. Uskoković, Poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanospheres. Part 3: Surface properties of antibiotic loaded core-shell drug carrier and corresponding *in vitro* cellular response, *In preparation*.
- [203] V. J. Stella, K. W. Nti-Addae, Prodrug strategy to overcome poor water solubility, *Adv. Drug Deliv.*, **59** (2007) 677-694.
- [204] O. W. Ackaert, J. D. Graan, R. Capancioni, O. E. D. Pasqua, D. Dijkstra, B. H. Westerink, M. Danhof, J. A. Bouwstra, The *in vitro* and *in vivo* evaluation of new synthesized prodrugs of 5-OH-DPAT for iontophoretic delivery, *J. Control. Release*, **144** (2010) 296-305.
- [205] M. Shi, Y.-Y. Yang, C.-S. Chaw, S.-H. Goh, S. M. Moochhala, S. Ng, J. Heller, Double walled POE/PLGA microspheres: encapsulation of water-soluble and water-insoluble proteins and their release properties, *J. Control. Release*, **89** (2003) 167-177.
- [206] T. Okuda, K. Tominaga, S. Kidoaki, Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nanofiber meshes, *J. Control. Release*, **143** (2010) 258-264.
- [207] C. T. Lo, P. R. V. Tassel, W. M. Salzman, Simultaneous release of multiple molecules from poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide) nanoparticles assembled onto medical devices, *Biomaterials*, **30** (2009) 4889-4897.
- [208] L. Wei, C. Cai, J. Lin, T. Chen, Dual-drug delivery system based on hydrogel/micelle composites, *Biomaterials*, **30** (2009) 2606-2613.



- [209] W. Morozowich, H. A. Karnes, Case study: clindamycin-2-phosphate, a prodrug of clindamycin, In: Prodrugs challenges and rewards Part 1, V. J. Stella, R. T. Borchardt, M. J. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J. W. Tilley (Eds.), Chapter 5.6, Springer, (2007) 508-509.
- [210] C. Thomas, M. Stevenson, T. V. Riley, Antibiotic and hospital-acquired *Clostridium defficile* – associated diarrhoea: a systematic review, *J. Antimicrob. Chemotherap.*, **51** (2003) 1339-1350.
- [211] M. Cimbollek, B. Nies, A. Liebendorfer, R. Wenz, J. Kreuter, The potential of the prodrug clindamycin palmitate as an implantable slow release form of the antibiotic clindamycin for heart valves, *J. Control. Release*, **33** (1995) 41-53.
- [212] D. S. Kohane, R. Langer, Biocompatibility and drug delivery systems, *Chem. Sci.*, **1** (2010) 441-446.
- [213] J. M. Anderson, Biocompatibility and bioresponse to biomaterials, *Princip. Regener. Med.*, **40** (2008) 704-723.
- [214] L. Tang, P. Thevenot, W. Hu, Surface chemistry influences implant biocompatibility, *Curr. Topic. Med. Chem.*, **8** (2008) 270-280.
- [215] C. H. J. Hauman, R. M. Love, Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances, *Int. Endod. J.*, **36** (2003) 75-85.
- [216] C. T. Hanks, J. C. Wataha, Z. Sun, *In vitro* models of biocompatibility: a review, *Dent. Mater.*, **12** (1996) 186-193.
- [217] U. Meyer, A. Buchter, H. P. Wiesmann, U. Joos, D. B. Jones, Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces, *Europ. Cell Mater.*, **9** (2005) 39-49.
- [218] T. V. Kumari, U. Vasudev, A. Kumar, B. Menon, Cell surface interactions in the study of biocompatibility, *Trend. Biomater. Artif. Organ.*, **15** (2002) 37-41.
- [219] T. Desmet, R. Morent, N. D. Geyter, C. Leys, E. Schacht, P. Dubruel, Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: a review, *Biomacromolec.*, **10** (2009) 2351-2378.
- [220] A. Kurella, Review paper: surface modifications for bioimplants: the role of laser surface engineering, *J. Biomed. Appl.*, **20(1)** (2005) 5-50.
- [221] C. M. Murphy, M. G. Haugh, F. J. O'Brien, The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, **31** (2010) 461-466.

- [222] A. F. Von Recum, T. G. Van Kooten, The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants, *J. Biomed. Sci.*, **7(2)** (1996) 181-198.
- [223] N. Mitik-Dineva, J. Wang, R. C. Mocanasu, P. R. Stoddart, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, Impact of nanotopography on bacterial attachment, *Biotechnol. J.*, **3(4)** (2008) 536-544.
- [224] B. Zhu, Q. Zhang, Q. Lu, Y. Xu, J. Yin, J. Hu, Z. Wang, Nanotopographical guidance of C6 glioma cell alignment and ordered growth, *Biomaterials*, **25** (2004) 4215-4223.
- [225] J. N. Barbosa, M. A. Barbosa, A. P. Aguas, Inflammatory responses and cell adhesion to self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold, *Biomaterials*, **25** (2004) 2557-2563.
- [226] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, M. J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, **16** (2005) 2346-2353.
- [227] N. Nath, J. Hyun, H. Ma, A. Chilkoti, Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions, *Surf. Sci.*, **570** (2004) 98-110.
- [228] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Biomaterials*, **31** (2010) 3657-3666.
- [229] M. E. Buck, A. S. Breitbach, S. K. Belgrade, H. E. Blackwell, D. M. Lynn, Chemical modification of reactive multilayered films fabricated from poly(2-alkenyl azlactone)s: design of surfaces that prevent or promote mammalian cell adhesion and bacterial biofilm growth, *Biomacromol.*, **10** (2009) 1564-1574.
- [230] M. Thein, F. Asphahani, A. Cheng, R. Buckmaster, M. Zhang, J. Xu, Response characteristics of single-cell impedance sensors employed with surface-modified microelectrodes, *Biosensor. Bioelectron.*, **25** (2010) 1963-1969.
- [231] E. Horisawa, K. Kubota, I. Tuboi, K. Sato, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium, *Pharm. Res.*, **19** (2002) 132-139.
- [232] T. Moriguchi, K. Yano, S. Nakagawa, F. Kaji, Elucidation of adsorption mechanism of bone-staining agent alizarin, *J. Colloid Interf. Sci.*, **260** (2003) 19-25.
- [233] Y. Liu, R. S. Foote, C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, R. S. Ramsey, J. M. Ramsey, Electrophoretic separation of proteins on microchips, *J. Microcolumn Separations*, **12** (2000) 407-411.
- [234] S.-M. Wang, S.-S. Bu, H.-M. Liu, H.-Y. Li, W. Liu, Y.-D. Wang, Separation and characterization of clindamycin phosphate and related impurities in injection by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23** (2009) 899-906.

- [235] K. McLeod, S. Kumar, R. St. C. Smart, N. Dutta, N. H. Voelcker, G. I. Anderson, R. Sekel, XPS and bioactivity study of the bisphosphonate pamidronate adsorbed onto plasma sprayed hydroxyapatite coatings, *Appl. Surf. Sci.*, **253** (2006) 2644-2651.
- [236] J. Bachmann, A. Ellies, K. H. Hartge, Development and application of a new sessile drop method to assess soil water repellency, *J. Hydrology*, **231-232** (2000) 66-75.
- [237] O. I. del Rio, A. W. Neumann, Asymmetric drop shape analysis: computational methods for the measurement of interfacial properties from the shape and dimensions of pendant and sessile drops, *J. Colloid Interf. Sci.*, **196** (1997) 136-147.
- [238] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Am. Chem. Soc.*, **60** (1938) 309-319.
- [239] A. G. Hausberger, P.P. DeLuca, Characterization of biodegradable poly(*D,L*-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **13** (1995) 747-760.
- [240] W. E. Hathaway, L. A. Newby, J. H. Githens, The acridine orange viability test applied to bone marrow cells I. Correlation with ztypan blue and eosin dye exclusion and tissue culture transformation, *Blood*, **23** (1964) 517-525.
- [241] J. A. Plumb, R. Milroy, S. B. Kaye, Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan adsorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay, *Cancer Res.*, **15** (1989) 4435-4440.
- [242] G. Schmalz, Agar overlay method, *Int. Endodont. J.*, **21** (1988) 59-66.
- [243] B. Smith (Ed.), Infrared spectral interpretation: A systematic approach, *CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA*, 1999.
- [244] Ch. Bharati, P. Jayaram, J. S. Raj, M. S. Kumar, V. Bhargavi, V. K. Handa, R. Dandala, A. Naidu, Identification, isolation and characterization of impurities of clindamycin palmitate hydrochloride, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48** (2008) 1211-1218.
- [245] S. A. Martel-Estrada, C. A. Martinez-Perez, J. G.. Chacon-Nava, P. E. Garcia-Casillas, I. Olivas-Armendariz, Synthesis and thermo-physical properties of chitosan/poly(*D,L*-lactide-co-glycolide) composites prepared by thermally induced phase separation, *Carbohydr. Polym.*, **81** (2010) 775-783.
- [246] H. Li, H. Li, Z. Guo, Y. Liu, The application of power ultrasound to reaction crystallization, *Ultrason. Sonochem.*, **13** (2006) 359-363.

- [247] M. D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization), *Ultrason. Sonochem.*, **14** (6) (2007) 717-724.
- [248] Y. Y. Huang, T. P. J. Knowles, E. M. Terentjev, Strength of nanotubes, filaments, and nanowires from sonication-induced scission, *Adv. Mater.*, **21** (2009) 3945-3948.
- [249] L. Mu, S. S. Feng, PLGA/TPGS nanoparticles for controlled release of paclitaxel, *Pharm. Res.*, **20** (2003) 1864-1972.
- [250] F. X. Jiang, B. Yurke, R. S. Schloss, B. L. Firestein, N. A. Langrana, The relationship between fibroblast growth and the dynamic stiffnesses of a DNA crosslinked hydrogel, *Biomaterials*, **31** (2010) 1199-1212.
- [251] B. Su, Z. Wang, J. Wang, S. Wang, Concentration of clindamycin phosphate aqueous ethanol solution by nanofiltration, *J. Membrane Sci.*, **251** (2005) 189-200.
- [252] L. Zhu, Y. Chen, J. K. Wang, Solubility of clindamycin phosphate in methanol, ethanol, and dimethyl sulfoxide, *J. Chem. Eng. Data*, **53** (2008) 1984-1985.
- [253] Y. Chen, J.-K. Wang, Solubility of clindamycin phosphate in binary water-ethanol solvent, *J. Chem. Eng. Data*, **52** (2007) 1908-1910.
- [254] D. A. Bernards, T. A. Desai, Nanoscale porosity in polymer films: fabrication and therapeutic applications, *Soft Matter*, **6** (2010) 1621-1631.
- [255] B. Palazzo, M. Iafisco, M. Laforgia, N. Margiotta, G. Natile, C. L. Bianchi, D. Walsh, S. Mann, N. Roveri, Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties, *Adv. Funct. Mater.*, **17** (2007) 2180-2188.
- [256] Y. I. Woo, M. H. Lee, H.-L. Kim, J.-C. Park, Cellular responses and behaviour of adipose-derived stem cells onto  $\beta$ -glucan and PLGA composites surface-modified by microwave-induced argon plasma, *Macromolec. Res.*, **18** (2010) 90-93.
- [257] T. M. Fahmy, R. M. Samstein, C. C. Harness, W. M. Saltzman, Surface modification of biodegradable polyesters with fatty acid conjugates for improved drug targeting, *Biomaterials*, **26** (2005) 5727-5736.
- [258] E. Ruiz-Hitzky, M. Darder, P. Aranda, K. Ariga, Advances in biomimetic and nanostructured biohybrid materials, *Adv. Mater.*, **22** (2010) 323-336.
- [259] C. S. Brazel, N. A. Pappas, Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers, *Polymer*, **40** (1999) 3383-3398.

- [260] A. M. Martins, C. M. Alves, F. K. Kasper, A. G. Mikos, R. L. Reis, Responsive and in situ-forming chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications: an overview of the last decade, *J. Mater. Sci.*, **20** (2010) 1638-1645.
- [261] T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug, *J. Control. Release*, **57** (1999) 171-185.
- [262] Y.-H. Lee, F. Mei, M.-Y. Bai, S. Zhao, D.-R. Chen, Release profile characteristics of biodegradable-polymer-coated drug particles fabricated by dual-capillary electrospray, *J. Control. Release*, **145** (2010) 58-65.
- [263] T. H. Lee, J. Wang, C. -H. Wang, Double-walled microspheres for the sustained release of a highly water soluble drug: characterization and irradiation studies, *J. Control. Release*, **83** (2002) 437-452.
- [264] O. S. Kluin, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, D. Neut, A surface-eroding antibiotic delivery system based on poly-(trimethylene carbonate), *Biomaterials*, **30** (2009) 4738-4742.
- [265] J. M. Karp, M. S. Shoichet, J. E. Davies, Bone formation on two-dimensional poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds *in vitro*, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **64** (2003) 388-396.

## BIBLIOGRAFIJA

---

**M. Vukomanović**

### Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije

#### Rad u vodećem međunarodnom časopisu (M22)

- M. Vukomanović, S. D. Škapin, T. Maksin, N. Ignjatović, V. Uskoković, D. Uskoković, "Poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanosphere. Part 1: Multifunctional system for controlled drug delivery", *Colloid Surf. Biointerf.*, 82 (2011) 404-413.
- M. Vukomanović, S. D. Škapin, I. Poljanšek, E. Žagar, B. Kralj, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanosphere. Part 2: Simultaneous release of a drug and a prodrug (clindamycin and clindamycin phosphate)", *Colloid. Surf. Biointerf.*, 82 (2011) 414-421.

#### Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

- M. Vukomanović, S. D. Škapin, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Properties of poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide)/hydroxyapatite biocomposite with loaded clindamycin", *SLONANO 2009*, 19-21 October 2009, Ljubljana, Slovenia. Oral presentation
- M. Vukomanović, T. Maksin, S. Škapin, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide)/hydroxyapatite/clindamycin core-shell nanospheres processed in the field of ultrasound", *Eleventh Annual Conference YUCOMAT 2009*, August 31- September 4 2009, Herceg Novi, Montenegro. Oral presentation
- N. Ignjatović, M. Stevanović, M. Vukomanović, D. Uskoković, "Tailored preparation of nano and micro composites as a new controlled bone drug delivery systems", *12th Annual Seminar & Meeting "Ceramics, Cell and Tissue"*, 19-22 May 2009, Firenze, Italy.

#### Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

- M. Vukomanović, S. D. Škapin, D. Uskoković, Morphological changes of poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide)/hydroxyapatite (PLGA/HAp) particles with loaded clindamycin during degradation process, 4. Dan Mladih Raziskovalcev KMBO, Institut "Jožef Stefan", Ljubljana, Slovenija, 11. Februar, 2010. Poster presentation

- M. Vukomanović, S. D. Škapin, B. Kralj, I. Poljanšek, E. Žagar, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Degradacija polimernog dela poli(*D,L*-laktid-*ko*-glikolid)/hidroksiapatit kompozita i otpuštanje antibiotika", 8<sup>th</sup> Conference for Young Researchers, Science and Engineering of New Materials 2009, December 21-23, Belgrade, 2009, Book of Abstracts. Oral presentation
- I. Šarčev, B. Petronijević, M. Jevtić, N. Ignjatović, "Ispitivanje biokompatibilnosti nanokompozitnog biomaterijala za kontrolisanu dostavu klindamicina- test citotoksičnosti", 8<sup>th</sup> Conference for Young Researchers, Science and Engineering of New Materials 2009, December 21-23, Belgrade, 2009, Book of Abstracts.
- M. Jevtić, M. Mitrić, M. Stevanović, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Morfološke karakteristike poli(*D,L*-laktid-*ko*-glikolid)/hidroksiapatit kompozitnog materijala i efikasnost inkapsulacije klindamicina", 7<sup>th</sup> Conference for Young Researchers, Science and Engineering of New Materials 2008, December 25-26, Belgrade, 2008, Book of Abstracts. Oral presentation

#### **Ostali objavljeni radovi i saopštenja**

##### **Rad u vodećem međunarodnom časopisu (M21)**

- M. Vukomanović, M. Mitrić, S. D. Škapin, E. Žagar, J. Plavec, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Influence of ultrasonic processing on the macromolecular properties of poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide) alone and in its biocomposite with hydroxyapatite", *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 17, Issue 5, June 2010, Pages 902-908.
- M. Jevtić, M. Mitrić, S. Škapin, B. Jančar, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Crystal structure of hydroxyapatite nano-rods synthesized by sonochemical homogeneous precipitation", *Crystal Growth and Design*, Volume 8, Issue 7, July 2008, Pages 2217-2222.
- M. Jevtić, A. Radulović, N. Ignjatović, M. Mitrić, D. Uskoković, "Controlled Assembly of Poly-*D,L*-lactide-*co*-glycolide/Hydroxyapatite Core-Shell Nanospheres under Ultrasonic Irradiation", *Acta Biomaterialia*, Volume 5, Issue 1, January 2009, Pages 208-218.

##### **Rad u međunarodnom časopisu (M23)**

- M. Jevtić and D. Uskoković, "Influence of Urea as Homogeneous Precipitation Agent on Sonochemical Hydroxyapatite Synthesis", *Materials Science Forum*, Volume 555, 2007, Pages 285-290.

### **Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33)**

- Magdalena Stevanović, Marija Jevtić, Dragan Uskoković, "Water-soluble vitamins loaded in biodegradable nanoparticles", 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 12-16, 2008, New York, New York U.S.A. Poster presentation
- M. Jevtić, S. Škapin, K. Krnel, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Ultrasound-induced stable planar spatial organization of poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide)/hydroxyapatite sphere-like particles", 9th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 26-29, Belgrade, Book of Abstracts volume II (2008) 573-574. Poster presentation

### **Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)**

- M. Jevtić, M. Mitrić, S. Škapin, I. Bračko, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Ultrasonic Deagglomeration and Particle Size Reduction of Hydroxyapatite by Coating With Poly(*D,L*-Lactide-*co*-Glycolide)", 10th Conference of the Yugoslav Materials Research Society - YUCOMAT 2008, Herceg Novi, Montenegro, September 8-12, 2008. Book of Abstracts. Poster presentation
- M. Stevanović, M. Jevtić, I. Jovanović, V. Pavlović, D. Uskoković, "Porous, poly (dl-lactide-*co*-glycolide)-based material for biomedical application" 10<sup>th</sup> Conference of the Materials Research Society- YUCOMAT 2008, Herceg Novi, Montenegro, September 8-12, 2008. Book of Abstracts.
- M. Jevtić, S. Škapin, E. Žagar, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Composition, morphology and structure of DLPLG/HAp nanocomposite fabricated in the field of ultrasound", WomenInNano Winter School, Book of Abstracts, 2008.
- M. Jevtić, N. Ignjatović, M. Mitrić, D. Uskoković, "Ultrasound synthesis of poly-DL-lactide-*co*-glycolide/hydroxyapatite core-shell nano- spheres", 6th World Biomaterials Congress 2008, Amsterdam, Book of Abstracts, 2008.
- M. Jevtić, M. Mitrić, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Sonochemical Preparation of Hydroxyapatite / Poly (lactide-*co*-glycolide) Composite", 9<sup>th</sup> Conference of the Yugoslav Materials Science- YUCOMAT 2007, Book of Abstracts.
- M. Jevtić, M. Mitrić, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Sonochemical Synthesis of Hydroxyapatite Using Homogeneous Precipitation Agent- Urea", 8<sup>th</sup> Conference of Yugoslav Materials Research Society – YUCOMAT 2006, Book of Abstracts, 2006.

### **Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)**

- M. Vukomanović, S. D. Škapin, Application of sonochemistry for formation of nanosized silver and silver/hydroxyapatite composite particles, 2nd Jožef Stefan International Postgraduate School Students' Conference-IPSSC, May 27, 2010, Ljubljana, Slovenia. Poster presentation



- V. Žunič, I. Bračko, M. Otoničar, T. Šetinc, M. Vukomanović, Development of materials for industrial application, 2nd Jožef Stefan International Postgraduate School Students' Conference-IPSSC, May 27, 2010, Ljubljana, Slovenia. Poster presentation
- A. Stanković, Lj. Veselinović, M. Vukomanović, D. Uskoković, "Uticaj parametara procesiranja na morfologiju mehanohemijski sintetisanog nanostrukturnog praha cink oksida", 8<sup>th</sup> Conference for Young Researchers, Science and Engineering of New Materials 2009, December 21-23, Belgrade, 2009, Book of Abstracts.
- M. Jevtić, A. Radulović, M. Mitrić, N. Ignjatović, S. Skapin, D. Uskoković, "Uticaj sintetskih parametara na morfologiju ultrazvučno sintetisanog DLPLG/HAp biokompozita", 6<sup>th</sup> Seminar for Young Researchers, 2007, Book of Abstracts.
- M. Jevtić, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Homogena sonohemijska precipitacija hidroksiapatita i uticaj stabilizatora na njegovu morfologiju", 5<sup>th</sup> Seminar for Young Researchers, Book of Abstracts, 2006.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а МАРИЈА ВУКОМАНОВИЋ

број индекса —

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

КОНТРОЛИСАНО ОСЛОБАЂАЊЕ АНТИБИОТИКА ИЗ НАЈСФЕРА ПОЛИ(4,4'-  
ФАКТИД-КО-ГЛИКОЛИД) / ХИДРОКСИПАРАТИТА СИНТЕТИСАНИХ У УЛТРАЗВУЧНОМ ПОЉУ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 12.11.2013.

Марија Вукомановић

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Контролисање ослобађање антибиотика из нанофера поли(Д,Л-  
-лактид-ко-гликолид)/хидроксидатита синтетисаних у ултразвучном пољу

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 12.11.2013.

